

國立台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



I. 合成 3-羥基黃酮雌二醇螢光探針並探討連接子對於分子光物理性質
及自組裝行為的影響

II. 發展可快速偵測光氣之螢光探針

I. Synthesis of 3-Hydroxyflavone-EDIOL Fluorescent Probes to Investigate
the Effect of Linkers on Photophysical Properties and Self-Assembly
Behaviors

II. Development of a Fluorescent Probe to Detect Phosgene with Rapid
Response

洪珮汝

Pei-Ju Hung

指導教授：陳昭岑 博士

Adivisor: Chao-Tsen Chen, Ph.D.

中華民國 106 年 10 月

October, 2017

謝誌

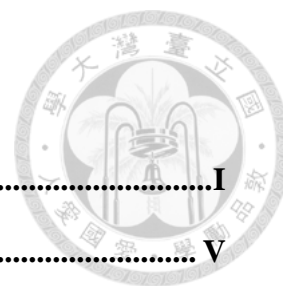


兩年的時間很快就過去了，一開始覺得不可能寫出來的論文也順利的生出來了，雖然耗時許久(苦笑)。回想這兩年多了時間，老實說，不苦是騙人的，從剛來台北就發生的宿舍小默契事件，到第一年時課業上的壓力和實驗上的碰壁，再加上人生地不熟，讓我曾萌生放棄的念頭，有段時間還需要靠看些勵志的話語才能撐過一天。但人生沒有過不去的關卡，家人們的支持和朋友的打氣讓我熬過來了。

一路上要感謝的人很多，最先感謝的當然是生我育我的母親大人，雖然她總是不明白我到底在忙什麼，也總說我都把她當作提款機，但沒有她的默默支持和照顧，我不可能走到今天，辛苦了，之後就換我當她的白金卡。再來要感謝我的指導教授陳昭岑老師，提供一個自由發揮且充裕的研究環境，以及在研究方向、化學知識和實驗態度上的指導與教誨，都讓我學到了很多。還要感謝我的專題指導教授吳安台老師，給那時還是專題生且什麼都不會的我一個進入實驗室的機會，奠定了實驗基礎。接著感謝實驗室的夥伴們，我的師傅胖哥，在他身上我學到很多實驗上的技巧，也因為他的帶領，我才能很快的進入狀況，就算他離開實驗室後也時常回來在實驗上給予我建議和指導；傲驕俊彥學長，雖然看起來兇兇的，但其實你只要問他問題他都會給出很好的解答；垂死她淳葦學姊，給予了很多就業上的建議，同時也是羽球團號召者，讓我們有運動的動力；有機神人昱屹學長，神一般的有機知識和教科書般的論文解救了愚鈍的我；打好夥伴吃飯股長力瑋，在課業上總是耐心的幫我解答問題，研究上的討論與幫助解決了許多問題；也是打好夥伴的司機育晴，畢業前半年應該有一半的時間都在承受我的重量，在很多事情上總是熱情的給予幫助；還有怕魚和你才臭勒的姿宇、有偶像包袱和互相嘴砲的俊翔、時常慢半拍和踢毬子達人的皓晨同志，因為有你們的相伴，讓苦悶的實驗中多了許多歡笑，也讓我能夠歡樂度過碩二的時間。要感謝的人太多，無法一一列舉，只能在此對於所有關懷過我、幫助我成長的人致上由衷的感謝。

2017.10.17 珮如 謹誌

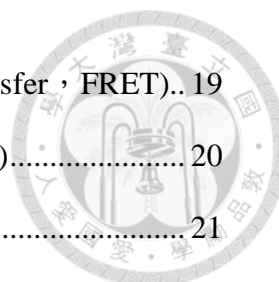
目錄



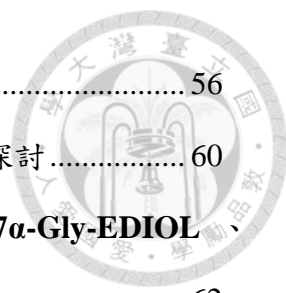
目錄	I
圖目錄	V
表目錄	XII
簡稱用語對照表	XIII
中文摘要	XVI
英文摘要	XVIII

第一部分 合成 3-羥基黃酮雌二醇螢光探針並探討連接子對於分子光物理性質及自組裝行為的影響


第一章 緒論	2
1.1 自組裝概念之簡介及其應用	2
1.1.1 影響自組裝形成之因素	2
1.1.2 兩性分子的堆積參數和自組裝形態	5
1.1.3 胜肽 (peptide) 兩性分子所形成之自組裝結構	6
1.1.4 尿素 (urea) 建構單元所形成之自組裝結構	8
1.1.5 生物活性建構單元所形成之自組裝結構及其應用	10
1.2 類固醇之簡介與其自組裝之應用	13
1.2.1 類固醇結構和種類	13
1.2.2 類固醇衍生物之自組裝介紹	15
1.3 比例 (ratiometric) 螢光團偵測機制	17
1.3.1 激發態分子內電荷轉移 (Excited-state intramolecular charge transfer, ESICT)	18
1.3.2 激發態分子內質子轉移 (Excited-state intramolecular proton transfer, ESIPT)	19



1.3.3 螢光共振能量轉移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)..	19
1.3.4 單體-激態附體之形成 (Formation of monomer-excimer).....	20
1.4 3-羥基黃酮 (3-Hydroxyflavone, 3-HF) 螢光團之介紹.....	21
1.4.1 3-Hydroxyflavone 雙螢光放射機制.....	22
1.4.2 3-Hydroxyflavone 衍生物之應用.....	24
1.5 以苯併呋喃 (benzofurazan) 為骨架的螢光團之介紹.....	25
1.5.1 以 benzofurazan 為骨架的螢光團之螢光特性.....	26
1.5.2 以 benzofurazan 為骨架的螢光團之應用.....	27
1.6 實驗室相關研究.....	29
第二章 雌二醇螢光分子之合成.....	34
2.1 HF-7α-Gly-EDIOL 、 HF-7α-U-EDIOL 、 DBD-7α-Gly-EDIOL 、 DBD-7α-U-EDIOL 之分子設計.....	34
2.2 共同前驅物化合物 8 之逆合成分析與合成步驟.....	37
2.3 螢光團衍生物 4'-EA-3-HF 與 7-EDADBD 之逆合成分析與合成步驟.....	41
2.3.1 螢光團衍生物 4'-EA-3-HF	42
2.3.2 螢光團衍生物 7-EDADBD	44
2.4 HF-7α-Gly-EDIOL 、 DBD-7α-Gly-EDIOL 之逆合成分析與合成步驟.....	45
2.4.1 HF-7α-Gly-EDIOL	46
2.4.2 DBD-7α-Gly-EDIOL	48
2.5 HF-7α-U-EDIOL 、 DBD-7α-U-EDIOL 之逆合成分析與合成步驟.....	50
2.5.1 DBD-7α-U-EDIOL	51
2.5.2 HF-7α-U-EDIOL	53
第三章 雌二醇螢光分子之物理性質探討.....	56
3.1 螢光性質探討.....	56



3.1.1 HF-7 α -Gly-EDIOL 與 HF-7 α -U-EDIOL 螢光性質探討.....	56
3.1.2 DBD-7 α -Gly-EDIOL 與 DBD-7 α -U-EDIOL 螢光性質探討.....	60
3.1.3 HF-7 α -Gly-EDIOL 、 HF-7 α -U-EDIOL 、 DBD-7 α -Gly-EDIOL 、 DBD-7 α -U-EDIOL 相對臨界聚集濃度之比較.....	62
3.1.4 螢光性質綜合討論與比較.....	66
3.2 超結構之尺寸、表面電性與型態鑑定.....	68
3.2.1 HF-7 α -Gly-EDIOL 、 HF-7 α -U-EDIOL 、 DBD-7 α -Gly-EDIOL 、 DBD-7 α -U-EDIOL 之動態光散射與表面電位量測之結果.....	68
3.2.2 HF-7 α -Gly-EDIOL 、 HF-7 α -U-EDIOL 、 DBD-7 α -Gly-EDIOL 、 DBD-7 α -U-EDIOL 於穿透式電子顯微鏡之實驗結果.....	70
3.2.3 超結構型態鑑定之綜合討論與比較.....	72
3.3 HF-7 α -Gly-EDIOL 、 HF-7 α -U-EDIOL 、 DBD-7 α -Gly-EDIOL 、 DBD-7 α -U-EDIOL 之細胞實驗測試.....	75
第四章 總結.....	78
 第二部分 發展可快速偵測光氣之螢光探針	
第一章 緒論.....	81
1.1 光氣介紹.....	81
1.2 光氣螢光探針之發展與其偵測機制.....	84
第二章 探針 7-EDADBBD 之合成.....	89
2.1 研究動機與目的.....	89
2.2 探針 7-EDADBBD 和產物 7-IDBD 之合成步驟.....	90
第三章 實驗結果與討論.....	91
3.1 探針 7-EDADBBD 和產物 7-IDBD 之溶劑效應.....	91
3.2 探針 7-EDADBBD 與產物 7-IDBD 之螢光性質和分子軌域能階.....	92



3.3 探針 7-EDADBD 與光氣之反應時間與鹼滴定實驗.....	95
3.4 探針 7-EDADBD 與光氣之滴定實驗與偵測極限.....	99
3.5 探針 7-EDADBD 與三光氣之反應機制和選擇性實驗.....	102
第四章 總結.....	105
實驗部分.....	106
一、一般敘述.....	106
二、生物活性測試方法.....	110
三、合成步驟及光譜數據.....	114
參考文獻.....	126
附錄.....	134

圖目錄



第一部分

- 圖 1-1 (a) 分子之間吸引力和排斥力關係圖。(b) 不可逆聚合和可逆有序自組裝之間本質區別之示意圖。..... 4
- 圖 1-2 可由臨界堆積參數 C_{pp} 預測兩性分子自組裝的結構形態。..... 6
- 圖 1-3 由七個 glycine 組成的胜肽鏈作為 linker 連接親疏水端的胜肽兩性分子結構圖。..... 7
- 圖 1-4 (a) 胜肽單體 G_nD_2 之 3D 空間分佈分子模型 (綠色為碳, 白色為氫, 紅色為氧, 藍色為氮), 由上到下分別為 G_4D_2 、 G_6D_2 、 G_8D_2 和 $G_{10}D_2$, 而分子長度範圍從 G_4D_2 2.4 nm 至 $G_{10}D_2$ 4.7 nm。(b) G_nD_2 自組裝形成奈米管狀 (上) 和奈米囊狀 (下) 結構模型示意圖 (結構模型直徑分別為 50 和 100 nm), glycine 為被包覆在雙層結構內部遠離水的綠色部分, aspartic acids 為外層暴露於水中之紅色部分。... .. 8
- 圖 1-5 (a) 尿素一維氫鍵鏈結構。(b) 由尿素氫鍵鏈和羧酸二聚體正交連接形成的二維層狀結構。(c) 上圖為仲丁基取代的四個尿素組成一具手性分子之結構, 下圖為手性分子由尿素-尿素氫鍵組裝成的三維四方多孔結構。..... 9
- 圖 1-6 大環雙尿素建構單元 (左上) 與自組裝形成空心柱狀結構 (左下) 示意圖。一系列代表性的大環雙尿素分子結構 (右上) 和其所對應的自組裝結構 (右下) 示意圖。..... 10
- 圖 1-7 具有生物活性功能分子組成 (上端紅色為具有生物活性之基團, 中端綠色為連接鏈, 下端橄欖綠為自組裝功能基團) 和其藉由非價作用力自組裝成不同的奈米結構示意圖。..... 11
- 圖 1-8 多共價效應示意圖。..... 12
- 圖 1-9 (a) 自組裝 turn-on 螢光探針偵測特定蛋白之感測機制示意圖。(b) 一系列蛋白質螢光探針之分子結構。..... 12

圖 1-10 (a) 類固醇結構與碳數編號。(b) 類固醇中 A/B 環為反式或順式之結構。	13
圖 1-11 具生理活性之雌性激素結構。	14
圖 1-12 以膽固醇為基礎的分子 ALS、A(LS) ₂ 和 LS ₂ 組分示意圖。	15
圖 1-13 (a) NA 和 NADC 分子結構圖。(b) NA 和 NADC 分子於 5 °C 下自組裝結構之 TEM 圖。(c) ISA 系統自組裝模式示意圖和 NA 和 NADC 分子於室溫下自組裝結構之 TEM 圖。	16
圖 1-14 在不同溶劑組成下 POM-Chol 分子自組裝結構示意圖。	17
圖 1-15 以 ICT 機制為基礎的探針之給電子基團或接受電子基團與陽離子結合後，能階差異與光譜偏移示意圖。	18
圖 1-16 以 HBO 分子為例的 ESIPT 機制圖。	19
圖 1-17 (a)(b) 供、受體吸收和放射光譜圖。左邊藍色為供體，右邊綠色為受體，虛線為吸收光譜，實線為放射光譜，中間橙色區域表示供體放射光譜與受體吸收光譜重疊部分。	20
圖 1-18 (a) 單體與激態複體螢光放射光譜之比較。(b) 上圖為探針 18 分子結構；下圖為探針 18 應用於比例感測 DNA 示意圖。	21
圖 1-19 3-羥基黃酮之結構。	22
圖 1-20 3-羥基黃酮衍生物之螢光放射機制示意圖。	23
圖 1-21 (a) FE 分子的螢光訊號經解迴旋分解成 N [*] 、N [*] -H、T [*] 三個峰 (藍色為 N [*] 峰、紅色為 T [*] 峰、綠色為 N [*] -H 峰、紫色為 N [*] 、N [*] -H、T [*] 三個峰之總合)。(b) FE 分子螢光放射隨不同溶劑極性或含氫鍵程度而變化示意圖。	24
圖 1-22 (a) 常見以 benzofurazan 為骨架的螢光試劑之結構圖。(b) 螢光試劑之胺類螢光衍生物結構圖。	25
圖 1-23 solvatochromic 效應對螢光影響示意圖。	27
圖 1-24 (a) 含聚合雙鍵官能基之苯併咪唑衍生物。(b) 不同溫度應答螢光高分子最強放射螢光強度對溫度作圖。分別為 PNIPAM 修飾 DBD-AE (●)、NBD-AE2 (▲)、	

NBD-AA (+)、ABD-TE (◆)、NBD-AE (x) 以升溫模式測量以及 DBD-AE (○) 以降溫模式測量。..... 28

圖 1-25 (a) 蛋白質螢光探針感測機制示意圖。(b) 一系列偵測特定蛋白質螢光探針之分子結構。..... 28

圖 1-26 HF-EDIOL、HF-EDINH₂、HF-EDISO₄H、HF-7 α -EDIOL、HF-3-EDIGuid、HF-3-EDICO₂H 與 HF-7-EDISO₄H 之結構圖 (藍色為余柔靚學姊分子，橘色為蘇怡文學姊分子)。..... 29

圖 1-27 (a-g) 上圖分別為 HF-EDIOL、HF-EDINH₂、HF-EDISO₄H、HF-7 α -EDIOL、HF-3-EDIGuid、HF-3-EDICO₂H 與 HF-7-EDISO₄H (10 μ M) 在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之螢光光譜， λ_{ex} = 354、355、359、359、356、362、357 nm， $slit_{ex}$ & $slit_{em}$ = 5 nm (HF-3-EDICO₂H 之 $slit_{ex}$, $slit_{em}$ = 2.5, 5 nm)。 (a-g) 下圖為相對應之螢光顯像圖，由左至右 DMSO 濃度分別為 5%，20%，40%，50%，60%，80%，100%。(h) HF-EDIOL、HF-EDINH₂、HF-EDISO₄H、HF-7 α -EDIOL、HF-3-EDIGuid、HF-3-EDICO₂H 與 HF-7-EDISO₄H (10 μ M) 在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之 ESICT/ESIPT 比例圖。..... 31

圖 2-1 HF-7 α -Gly-EDIOL、HF-7 α -U-EDIOL、DBD-7 α -Gly-EDIOL 和 DBD-7 α -U-EDIOL 之分子結構設計與分子結構圖。..... 35

圖 2-2 化合物 I、II、III、III_a 之結構及在乙酸乙酯 (□)、二氯甲烷 (Δ)、乙腈 (○) 中之螢光光譜。..... 36

圖 2-3 化合物 8 之逆合成分析。..... 37

圖 2-4 螢光團衍生物 4'-EA-3-HF 之逆合成分析。..... 42

圖 2-5 螢光團衍生物 7-EDADBD 之逆合成分析。..... 44

圖 2-6 螢光團衍生物 HF-7 α -Gly-EDIOL 之逆合成分析。..... 46

圖 2-7 螢光團衍生物 DBD-7 α -Gly-EDIOL 之逆合成分析。..... 49

圖 2-8 螢光團衍生物 DBD-7 α -U-EDIOL 之逆合成分析。..... 51

圖 2-9 螢光團衍生物 HF-7 α -U-EDIOL 之逆合成分析。..... 54

圖 3-1 **HF-7 α -Gly-EDIOL** (10 μ M) 分子在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之 (a) 螢光光譜, $\lambda_{ex} = 356$ nm, $slit_{ex}$ & $slit_{em} = 5$ nm; (b) 吸收光譜; (c) 相對應之螢光顯像圖, 由左至右 DMSO 濃度分別為 5%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 100%; (d) ESICT/ESIPT 比例圖。 (e) 3-HF⁻...DMSOH⁺ 錯合物生成示意圖。 58

圖 3-2 **HF-7 α -U-EDIOL** (10 μ M) 分子在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之 (a) 螢光光譜, $\lambda_{ex} = 356$ nm, $slit_{ex}$ & $slit_{em} = 5$ nm; (b) 吸收光譜; (c) 相對應之螢光顯像圖, 由左至右 DMSO 濃度分別為 5%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 100%; (d) ESICT/ESIPT 比例圖。 (e) **HF-7 α -U-EDIOL** 分子之間氫鍵作用力示意圖。 59

圖 3-3 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** (a-c) 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** (d-f) (10 μ M) 分子在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之 (a、d) 螢光光譜, $\lambda_{ex} = 442$ nm, $slit_{ex}$ & $slit_{em} = 5$ nm; (b、e) 相對應之螢光顯像圖, 由左至右 DMSO 濃度分別為 5%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 100%; (c、f) 螢光強度圖。 61

圖 3-4 左圖 (A) 兩性分子結構 (B) 兩性分子於空氣-水介面的排列方式 (C) 微胞結構。右圖為溶液表面張力對界面活性分子濃度做圖和微胞形成示意圖。 .62

圖 3-5 不同濃度的 (a) **HF-7 α -Gly-EDIOL**、(b) **HF-7 α -U-EDIOL**、(c) **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 (d) **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子在 5% DMSO 水溶液中之螢光表現。(a) (b) 圖為 ESICT/ESIPT 比例 vs 濃度圖, $\lambda_{ex} = 356$ nm, $slit_{ex}$ & $slit_{em} = 5$ nm。 (c) (d) 圖為螢光強度 vs 濃度圖, $\lambda_{ex} = 442$ nm, $slit_{ex}$ & $slit_{em} = 5$ nm。圖的下方為相對應之螢光顯像圖, 由左至右濃度分別為 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 30, 50, 100 μ M。 (e) **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子在 5% DMSO 水溶液中之轉折點濃度表。 65

圖 3-6 雌二醇螢光分子 **HF-7 α -EDIOL**、**HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 之分子結構。 67

圖 3-7 (a) **HF-7 α -Gly-EDIOL**、(b) **HF-7 α -U-EDIOL**、(c) **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 (d) **DBD-7 α -U-EDIOL** 於 5% DMSO 水溶液之粒徑大小分布 (分子濃度均為 2×10^{-4} M)。 69

圖 3-8 (a) **HF-7 α -Gly-EDIOL**、(b) **HF-7 α -U-EDIOL**、(c) **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 (d) **DBD-7 α -U-EDIOL** 於 5% DMSO 水溶液之穿透式電子顯微鏡觀測結果 (分子濃度均為 2×10^{-4} M)。左圖均為倍率較小之圖像，右圖均為倍率較大之圖像。72

圖 3-9 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 對 MCF-7 乳癌細胞之雷射掃描式共軛焦電子顯微鏡影像圖。圖中波長為收光範圍，上方第一欄為收取 415-470 nm 之 ESICT 螢光放射峰；第二欄為收取 505-550 nm 之 ES IPT 螢光放射峰；第三欄為可見光穿透影像 (Bright field)；第四欄為前三欄之疊合 (ESICT 與 ES IPT 之激發波長均為 405 nm)。下方第一欄為收取 555-610 nm 之螢光放射峰；第二欄為可見光穿透影像；第三欄為為前二欄之疊合 (激發波長為 405 nm)。由上之下依序為 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL**、**DBD-7 α -U-EDIOL** 分子。..... 77

第二部分

圖 1-1 (a) 上圖為以 FRET 為基礎的光氣感測系統示意圖，下圖為兩個螢光分子與光氣反應前後分子結構圖。(b) 光氣感測系統進行光氣滴定 (0.03-5 eq) 實驗之螢光光譜圖， $\lambda_{ex} = 343$ nm (箭頭代表隨著光氣濃度增加螢光強度的變化)。兩個螢光分子溶於氯仿中，濃度為 1×10^{-3} M，以 1:1 先混合在一起，再加入 TEA (10 equiv.)，然後進行滴定實驗。..... 85

圖 1-2 上圖為 **PY-OPD** 螢光探針與光氣和 DCP 反應前後分子結構和螢光變化示意圖；下圖右為 **PY-OPD** 螢光探針 (10 μ M 於氯仿) 逐漸加入三光氣 (0-2 equiv.) 之螢光光譜圖， $\lambda_{ex} = 580$ nm；下圖左為 **PY-OPD** 螢光探針 (10 μ M 於氯仿) 逐漸加入 DCP (0-100 equiv.) 之螢光光譜圖， $\lambda_{ex} = 470$ nm (內插圖為加入光氣或 DCP 前後螢光顯色圖：A 為 **PY-OPD**，右 B 為 **PY-OPD-phosgene**，左 B 為 **PY-OPD-DCP**；箭頭代表隨著光氣或 DCP 濃度增加螢光強度的變化)。..... 87

圖 1-3 (a) **8-EDAB** 螢光探針與光氣反應前後分子結構和螢光變化示意圖 (內插圖為加入光氣前後螢光顯色圖：左邊藍色螢光為 **8-EDAB**，右邊綠色螢光為 **8-EDAB-phosgene**)。(b) **8-EDAB** 螢光探針 (10 μ M 於乙腈) 逐漸加入三光氣

(0-0.6equiv.) 之螢光光譜圖， $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$ (箭頭代表隨著光氣濃度增加螢光強度的變化)。	88
圖 2-1 螢光團衍生物 7-EDADBD 和三光氣反應之反應式。	89
圖 3-1 (a) 7-EDADBD 和 (b) 7-IDBD ($10 \mu\text{M}$) 在不同極性溶劑中之 normalized 吸收 (虛線) 和螢光 (實線) 光譜， $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ (箭頭代表隨著溶劑極性增加螢光波長的變化)。(c) 7-EDADBD (橄欖綠) 和 7-IDBD (藏青色) 在不同溶劑之螢光柱狀圖。	92
圖 3-2 (a) 7-EDADBD 和 7-IDBD ($10 \mu\text{M}$) 溶於 ACN 之吸收 (虛線) 和螢光 (實線) 光譜， $\lambda_{\text{ex}} = 426 \text{ nm}$ (7-EDADBD) & 398 nm (7-IDBD)。(b) 7-EDADBD 和 7-IDBD ($10 \mu\text{M}$) 溶於 DCM 之吸收 (虛線) 和螢光 (實線) 光譜， $\lambda_{\text{ex}} = 424 \text{ nm}$ (7-EDADBD) & 396 nm (7-IDBD)。 $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ (內插圖為 7-EDADBD (左) 和 7-IDBD (右) 之螢光顯色圖)。	93
圖 3-3 利用 DFT 理論計算 7-EDADBD 和 7-IDBD 之電子密度分佈和前緣分子軌域能階分佈示意圖。	95
圖 3-4 7-EDADBD ($10 \mu\text{M}$) 在 (a) ACN 和 (b) DCM 溶劑中與三光氣 (0.7 equiv.) 反應之時間過程螢光光譜。(c) 特定波長 (ACN : 529 nm ; DCM : 507 nm) 之螢光強度和 7-IDBD 在該波長下之螢光強度比值對時間作圖。 $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}$ (ACN) & 396 nm (DCM)， $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ 。	96
圖 3-5 7-EDADBD ($10 \mu\text{M}$) 在 ACN (a) 和 DCM (b) 溶劑中於不同濃度 TEA 存在下與 0.7 當量三光氣反應之特定放射波長 (ACN : 529 nm ; DCM : 507 nm) 螢光強度對不同 TEA 濃度作圖。 $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}$ (ACN) & 396 nm (DCM)， $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ 。	97
圖 3-6 (a) 7-EDADBD ($10 \mu\text{M}$) 溶於 ACN 中，在 TEA ($0.1 \mu\text{M}$) 存在下和三光氣 (0.7 equiv.) 反應之時間過程螢光光譜。(b) 7-EDADBD ($10 \mu\text{M}$) 溶於 DCM 中，在 TEA ($1 \mu\text{M}$) 存在下和三光氣 (0.7 equiv.) 反應之時間過程螢光光譜。(c) 特定波長 (ACN : 529 nm ; DCM : 507 nm) 之螢光強度和 7-IDBD 在該波長下之螢光強度比	

值對時間作圖。 $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm (ACN) \& } 396 \text{ nm (DCM)}$ ， $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ 。

98

圖 3-7 **7-EDADBD** (10 μM) 於 (a) ACN 和 (b) DCM 溶劑中在 TEA 存在下 (ACN : 0.1 μM ; DCM : 1 μM) 加入不同當量的三光氣 (0-2 equiv.) 進行滴定實驗之螢光光譜。 $\lambda_{\text{ex}} = 421 \text{ nm (ACN) \& } 413 \text{ nm (DCM)}$ ， $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ (箭頭代表隨三光氣濃度增加螢光強度的變化)。(c) ACN 和 (d) DCM 溶劑中特定波長 (ACN : 529 nm ; DCM : 507 nm) 之螢光強度對不同三光氣當量數作圖。..... 100

圖 3-8 **7-EDADBD** (10 μM) 在 (a) ACN 和 (b) DCM 溶劑中特定波長 (ACN : 529 nm ; DCM : 507 nm) 之螢光強度對不同三光氣濃度 (0-6 μM) 作圖。 $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm (ACN) \& } 396 \text{ nm (DCM)}$ ， $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ 。..... 101

圖 3-9 探針 **7-EDADBD** 與三光氣反應機制示意圖。..... 102

圖 3-10 (a) 不同活性物質之分子結構。**7-EDADBD** (10 μM) 於 (b) ACN 和 (c) DCM 溶劑中與三光氣 (0.7 equiv.) 和不同活性物質 (20 equiv.) 進行選擇性實驗之螢光光譜。 $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm (ACN) \& } 396 \text{ nm (DCM)}$ ， $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ 。(d) 特定波長 (ACN : 529 nm ; DCM : 507 nm) 之螢光強度柱狀圖。..... 104

表目錄



第一部分

表 1-1 分子自組裝之主要非共價作用力強度。	4
表 1-2 HF-EDIOL 、 HF-7α-EDIOL 、 HF-EDINH₂ 、 HF-3-EDIGuid 、 HF-EDISO₄H 、 HF-7-EDISO₄H 與 HF-3-EDICO₂H (200 μ M) 之超結構型態鑑定綜合整理表。 ..	32
表 3-1 HF-7α-Gly-EDIOL 、 HF-7α-U-EDIOL 、 DBD-7α-Gly-EDIOL 和 DBD-7α-U-EDIOL 之螢光性質比較。	66
表 3-2 HF-EDIOL 、 HF-7α-EDIOL 、 HF-7α-Gly-EDIOL 、 HF-7α-U-EDIOL 、 DBD-7α-Gly-EDIOL 和 DBD-7α-U-EDIOL 於 5% DMSO 水溶液中 (分子濃度均為 2×10^{-4} M) 之超結構型態鑑定結果整理表。	74

第二部分

表 1-1 人類對不同急性光氣暴露劑量的反應。	82
表 1-2 不同光氣暴露條件產生的症狀。	83
表 1-3 代表性光氣螢光探針之整理表。	86
表 3-1 探針 7-EDADBD 在不同溶劑和 TEA 濃度下和三光氣反應之平衡時間和轉換率整理表。	99
表 4-1 探針 7-EDADBD 相關實驗數據整理表。	105

簡稱用語對照表



AA : acetic anhydride

AC : acetyl chloride

ACN : acetonitrile

Boc : *tert*-butyloxycarbonyl

C_{pp} : critical packing parameter

CAC : chloroacetyl chloride

CAC : critical aggregation concentration

CMC : critical micelle concentration

DBD : *N,N*-dimethyl-2,1,3-benzoxadiazole-7-sulfonamide

DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

DCM : dichloromethane

DCP : diethyl chlorophosphate

DFT : density functional theory

DHP : 3,4-dihydro-2H-pyran

DIAD : diisopropyl azodicarboxylate

DIPEA : *N,N*-Diisopropylethylamine

DLS : dynamic light scattering

DMAP : dimethylaminopyridine

DMEM : dulbecco's modified eagle medium

DMF : *N,N*-dimethylformamide

DMSO : dimethyl sulfoxide

DNA : deoxyribonucleic acid

EDA : ethylenediamine

EDIOL : estradiol



ER : estrogen receptor

ESICT : excited state intramolecular charge transfer

ESI-HRMS : Electrospray-Ionization High-Resolution Mass

ESIPT : excited state intramolecular proton transfer

FBS : fetal bovine serum

FE : 4'-diethylamino-3-hydroxyflavone

FRET : fluorescence resonance energy transfer

Gly : glycine

HBO : 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazole

3-HF : 3-hydroxyflavone

HOMO : highest occupied molecular orbital

HPLC : high performance liquid chromatography

IR : Infrared Spectrum

ISA : ionic self-assembly

LBD : ligand binding domain

LCST : lower critical solution temperature

LDA : lithium diisopropylamide

LOD : limit of detection

LUMO : lowest unoccupied molecular orbital

MVE : multivalent effect

NA : 1-naphthylammonium chloride

NaDC : sodium deoxycholate

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

NMR : nuclear magnetic resonance

OC : oxalyl chloride

OP : organophosphate



OPD : o-phenylenediamine
PA : peptide amphiphile
PBS : phosphate buffer saline
PCC : pyridinium chlorochromate
PDI : polydispersity index
PET : photoinduced electron transfer
Ph : phenyl
PMA : Phosphomolybdic acid
POC : phosphorus oxychloride
PPTS : pyridinium *p*-toluenesulfonate
SC : sulfuryl chloride
SEM : scanning electron microscope
S_NAr : nucleophilic aromatic substitution
TC : thionyl chloride
TEA : triethylamine
TEM : transmission electron microscope
TFA : trifluoroacetic acid
THF : tetrahydrofuran
THP : tetrahydropyran
TLC : thin layer chromatography
TP : thiophosgene
UA : uranyl acetate
UV/Vis : ultraviolet/visible spectrum

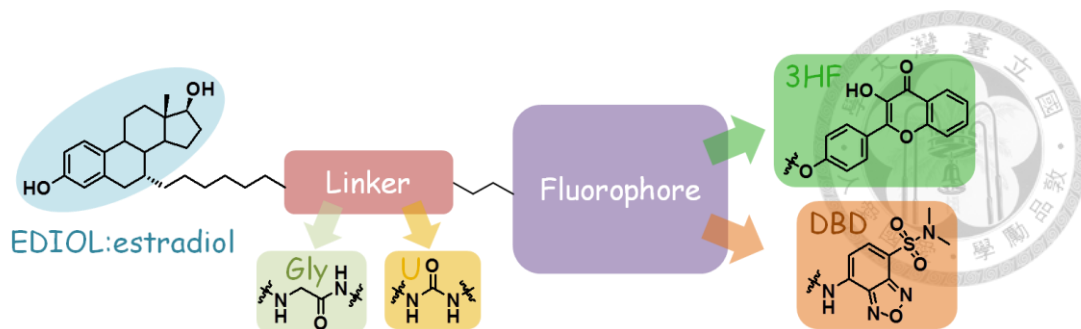
中文摘要



第一部分

自組裝已被廣泛應用於材料科學、化學和生物學中，作為自下而上建構奈米至微米等級大小的有序且高度複雜結構的方法。基於先前研究的啟發，本論文設計並合成了由 **3-HF** 或 **DBD** 和雌二醇組成的一系列螢光探針：**HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL**，進一步探討若在連接雌二醇和螢光團的連接鏈上作修飾，對分子光物理性質和自組裝行為的影響。此外，選擇的螢光團 **3-HF** 或 **DBD** 為對環境高度敏感的螢光團，通過探測 **3-HF** 的 **ESIPT/ESICT** 螢光強度比或 **DBD** 的螢光強度變化，可以推測出超分子奈米結構的形態。透過動態光散射、表面電位和穿透式電子顯微鏡成像的實驗，可以確認這些聚集的形態。

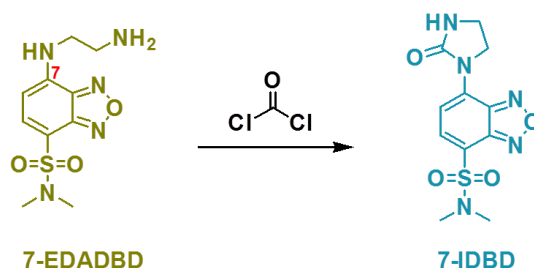
在不同比例 **DMSO/H₂O** 溶劑中之螢光測試結果發現，**HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 這四個分子均有螢光反轉的現象，初步推測分子發生了聚集。由 **DLS** 和 **TEM** 實驗結果可進一步得知，**HF-7 α -Gly-EDIOL** 聚集結構為球狀，但彼此交聯在一起，大小約 70-400 nm；**HF-7 α -U-EDIOL** 只觀測到大小不一的不規則形狀（類圓球狀），尺寸直徑約落在 80 nm 左右；**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 聚集為不規則形狀，一樣也是彼此交聯在一起，而交聯狀匯集處呈類圓球狀，大小約小於 100 nm；**DBD-7 α -U-EDIOL** 聚集為完美的球狀，大小較為均一，約為 135-160 nm。結果顯示在連接鏈上修飾甘胺酸 (**Gly**) 和尿素 (**U**) 這兩個基團則是影響分子在水中傾向聚集的能力。由細胞實驗結果可知，相較於連接鏈修飾上尿素基團的分子，連接鏈修飾上甘胺酸之 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 均能進入細胞，且大多分布在細胞質當中，反映這兩個分子在生物上的應用是具有潛力的。



關鍵詞：自組裝、奈米結構、雌二醇衍生物、**3-HF**、**DBD**

第二部分

光氣是一種無色且劇毒的氣體，暴露於光氣會造成嚴重的急性呼吸道作用，包括非心源性肺水腫，肺氣腫和死亡。鑑於其強大的殺傷力和大規模工業用途，光氣幾乎對公共衛生安全構成嚴重威脅，不僅是因為恐怖分子潛在的使用，也因工業事故造成的意外釋放。因此，為了保護公眾健康和不受光氣的傷害，發展能有效且快速偵測低於安全濃度之光氣的螢光探針具有重要意義。本論文中，使用乙二胺作為識別部分和 7 號位置有取代的 **DBD** 單元作為螢光團的部分，開發出具有低至 12.2 nM 的偵測極限和小於 5 分鐘的反應時間之新型光氣探針 **7-EDADBD**。該探針和光氣進行加成-離去和分子內環化反應後，可得到產物 **7-IDBD**，其最大吸收和放射波長均藍移，螢光強度有 15.6 倍（在 ACN 溶劑中）或 5.3 倍（在 DCM 溶劑中）的增強。此外，和其他類似反應性之有毒化學物質相比，**7-EDADBD** 對於光氣具有顯著的選擇性。



關鍵詞：光氣、乙二胺基團、分子內環化、**DBD**、螢光探針

Abstract

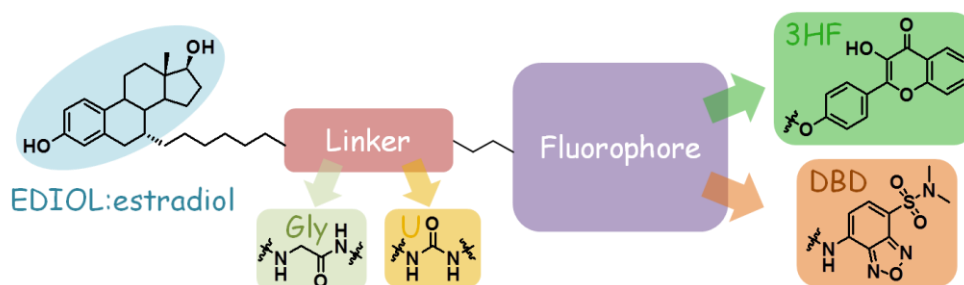


Part I.

Self-assembly has been widely used in materials science, chemistry, and biology as a bottom-up approach to create ordered structures at the nanometer to micrometer scale with high complexity. Inspired by our previous findings, this thesis would focus on the effects of linker linking the fluorophore and estradiol on the photophysical properties and self-assembly behaviors should be further investigated. Moreover, two environmentally sensitive fluorophores such as 3-hydroxyflavone (**3-HF**) and 4-sulfamonyl-7-aminobenzoxadiazole (**DBD**) having emission properties that are highly sensitive to their immediate environment were chosen to be incorporated into the molecular designs respectively. Accordingly, a series of fluorescent probes **HF-7 α -Gly-EDIOL**, **HF-7 α -U-EDIOL**, **DBD-7 α -Gly-EDIOL**, and **DBD-7 α -U-EDIOL** consisting of either **3-HF** or **DBD** and estradiol were designed and synthesized. By probing the ES IPT/ES ICT fluorescence intensity ratios of **3-HF** or the fluorescent intensity changes of **DBD**, the morphology of the supramolecular nanostructures can be speculated. In the combination of DLS, zeta potential, and TEM images, the morphologies of the aggregates can be confirmed.

The fluorescence spectra of **HF-7 α -Gly-EDIOL**, **HF-7 α -U-EDIOL**, **DBD-7 α -Gly-EDIOL**, and **DBD-7 α -U-EDIOL** showed fluorescence reversal in different proportions of DMSO/H₂O solvents. Based on these observations, the aggregates with the fluorophore pointed inward were speculated. DLS and TEM experiments further confirmed that the aggregates of **HF-7 α -Gly-EDIOL** are cross-linked spheres with a diameter of 70-400 nm; the aggregates of **HF-7 α -U-EDIOL** are irregular spheres with the size of about 80 nm; the aggregates of **DBD-7 α -Gly-EDIOL** are irregular shapes, while cross-linked areas are spherical, with

the size of less than 100 nm; the aggregates of **DBD-7 α -U-EDIOL** are perfect globular with uniform size and a diameter of about 135-160 nm. In summary, the results indicate that modifying Gly or Urea functional groups on the linker would affect the aggregate ability of molecules in the water. In the cell imaging experiments, **HF-7 α -Gly-EDIOL** and **DBD-7 α -Gly-EDIOL** containing Gly linker were able to enter the cells and were mostly distributed in the cytoplasm. Its reveals that the potential application of these two molecules in biology.

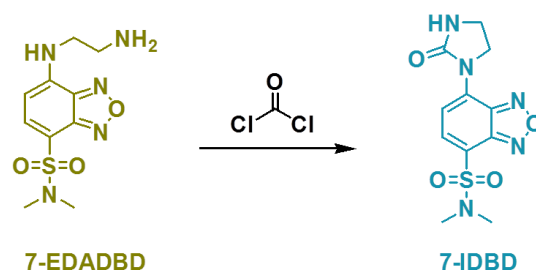


Keywords : self-assembly, nanostucture, estradiol derivative, **3-HF**, **DBD**

Part II.

Phosgene is a colorless and highly toxic gas. Exposure to phosgene has severe acute respiratory effects, including noncardiogenic pulmonary edema, pulmonary emphysema, and death. In light of its strong lethality and large-scale industrial use, phosgene virtually poses a serious threat to public health safety, not only because of its potential use by terrorists, but also because of its unexpected release during industrial accidents. Therefore, developing an efficient fluorescent probe for facile and rapid detection of phosgene with concentration below the safety margin is of great significance for protecting public health and safety from the chance of exposing harmful phosgene. Herein, a new type of phosgene probe **7-EDADBD** with a detection limit down to 12.2 nM and response time of less than 5 min was developed. The probe

consisting of ethylenediamine as the recognition moiety and 7-substituted **DBD** unit as the fluorescence signaling component. It undergoes sequential phosgene-mediated addition-elimination reaction and intramolecular cyclization with fast rate, yielding a product **7-IDBD** with blue-shifts in the absorbance and emission spectra as well as 15.6-fold (ACN) or 5.3-fold (DCM) fluorescence enhancement. Furthermore, **7-EDADB** displayed remarkable reactivity toward phosgene over other similarly reactive toxic chemicals.



Keywords : phosgene, ethylenediamine group, intramolecular cyclization, **DBD**, fluorescence probe



第一部分

合成 3-羥基黃酮雌二醇螢光探針並探討連接子對於分子光物理性質及

自組裝行為的影響

第一章 緒論



1987 年其中一位諾貝爾化學家得主 Jean-Marie Lehn 曾說過一句話「不論是無生命的物質或是生命體本身，都是由分子或分子間的相互作用力所構成。」表明宇宙萬物都是分子所組成，也揭開以分子間作用力為核心之「超分子化學 (supramolecular chemistry)」^{1,2,3} 的序幕。以往化學家大多針對共價鍵的生成與破壞，進行化學變化的研究，也造就種類多如恆河沙數的分子，而超分子化學則是專注於分子間的非共價作用 (noncovalent interactions)，並控制分子間的作用力，依自然界中熱力學最穩定之狀態，自發性組成超分子結構。超分子化學涵蓋領域甚廣，包括分子自組裝 (molecular self-assembly)、分子辨識 (molecular recognition)、⁴ 摺疊 (folding)、主-客體化學 (host-guest chemistry) 等。而分子自組裝的核心是源自於分子辨識，唯有透過分子辨識，超分子自組裝系統才能表現出特定選擇性結合組裝的功能。自組裝已經廣泛應用於材料科學、化學和生物學上，作為自下而上 (bottom up) 製造奈米至微米等級大小的有序且高度複雜結構的方法。

1.1 自組裝概念之簡介及其應用

分子自組裝普遍存在於化學，材料科學和生物學中。^{5,6} 分子晶體⁷、膠體⁸、雙層磷脂質⁹、相分離 (phase-separated) 的聚合物¹⁰ 和自組裝單層¹¹ 的形成都是分子自組裝的實例，而生物體內多肽鏈折疊成蛋白質¹² 或核酸折疊成其功能形態，¹³ 甚至配體與受體的結合也是自組裝的一種形式。¹⁴ 自組裝、分子識別、錯合 (complexation)，以及其他由散亂的分子組成有序排列分子的過程之間的語義界限，會隨著使用者的想法而擴大或縮小。

1.1.1 影響自組裝形成之因素

歷史上自組裝的概念來自研究分子的過程，分子系統中自組裝成功與否由系統的五個特徵決定：¹⁵



(1) 組件 (components): 自組裝系統由一群彼此相互作用的分子或大分子片段組成, 這些分子或分子片段可以相同或不同, 而這些分子間的相互作用導致系統從較不有序的狀態 (溶液、散亂聚集體或隨機螺旋) 到更有序的最終狀態 (晶體或折疊的大分子)。

(2) 交互作用 (interactions): 自組裝發生在組件之間存在淨吸引力和平衡分離 (equilibrium separation) 時, 而平衡分離通常代表吸引力和排斥之間的平衡, 如圖 1-1 (a) 所示。這些相互作用力通常較弱 (即與熱能相當) 且為非共價作用力, 例如氫鍵 (hydrogen-bonding)、凡得瓦力 (van der Waals)、庫倫靜電作用力 (coulomb electrostatic interaction)、 π - π 堆積 (π - π stacking) 或疏水作用力 (hydrophobic interaction) 等, 整理如表 1-1 所示, 但相對較弱的共價鍵 (配位鍵) 被認為越來越適合於自組裝。^{16,17} 自組裝組件之間的形狀互補性也至關重要。

(3) 可逆性 (reversibility): 自組裝為了可以產生有序結構, 其過程必須是可逆的, 或必須允許組件在聚合體內可以調整它們的位置。若組分 (藍色) 之間相互作用是不可逆的, 則組分之間一旦黏附便無法再作調整, 故形成不規則排列的玻璃 (綠色); 若組分之間相互作用是一個平衡狀態, 並在接觸後可以調整其位置, 便可形成較低能量的有序晶體結構 (紅色), 如圖 1-1 (b) 所示。

(4) 環境 (environment): 分子的自組裝通常在溶液中或在界面處進行以允許組件所需的運動, 組件與環境的相互作用會嚴重影響自組裝的過程。

(5) 集體運輸和攪拌 (mass transport and agitation): 為了自組裝發生, 分子必須是可移動的。在溶液中, 熱運動提供了使分子接觸所需移動的主要部分。在奈米尺度、微觀和巨觀的自組裝系統中, 組分之間的相互作用和在分子系統中類似, 而在設計這種系統時, 第一個挑戰往往是確保組件的移動性, 隨著它們變得比分子大, 布朗運動變得無關緊要, 而重力和摩擦力則變得重要, 故組件之間交互作用的選擇 (也就是選擇允許系統接近平衡的交互作用) 也很重要。



表 1-1 分子自組裝之主要非共價作用力強度。¹⁸

Bonding and interaction type	kJ/mol
Covalent bond	100–400
Ion-ion/ion-dipole/dipole-dipole	200–300/50–200/5–50
Hydrogen bond	4–120
Cation- $n(\pi)$ interaction	5–80
π - π interaction	0–50
van der Waals interaction	(<5 kJ/mol)
Hydrophobic effects	Entropy
Metal-ligand	0–400

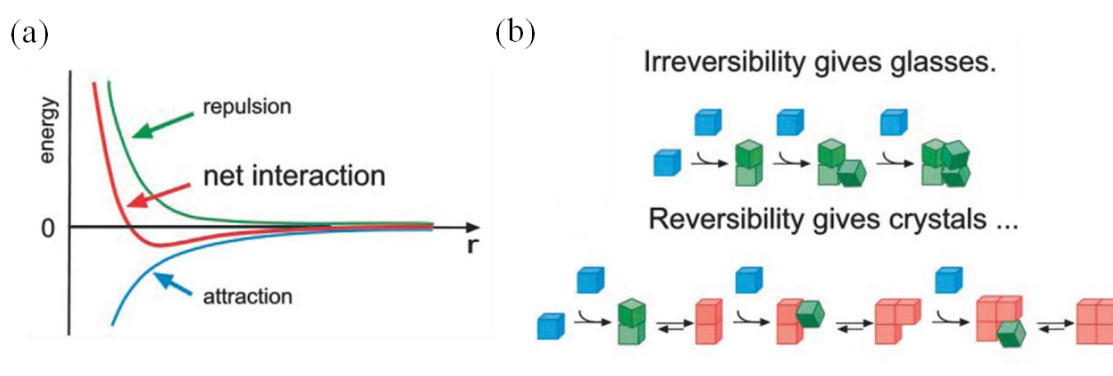


圖 1-1 (a) 分子之間吸引力和排斥力關係圖。(b) 不可逆聚合和可逆有序自組裝之間本質區別之示意圖。¹⁵

自組裝在科學上是有趣的和技術上是重要的原因至少有四個：第一，它在生活中是非常重要的，細胞中含有許多驚人且複雜的結構，例如脂質膜、折疊的蛋白、結構化核酸、蛋白質聚集體，分子機械以及通過自組裝形成的許多其他結構。¹⁹ 第二，自組裝為一系列具有規則結構的材料提供了路線，如分子晶體、²⁰ 液晶、²¹ 半結晶和相分離的聚合物²² 等。第三，自組裝也廣泛地發生在大於分子的結構體系中，並且在材料和凝聚物科學中具有很大的潛力。²³ 第四，自組裝似乎提供了現在可用於產生奈米結構的最普遍策略之一。因此，自組裝在化學、物理、生物、材料科學、奈米科學和製造領域都具有重要地位，通過這些領域之間概念和技術的交換，自組裝的發展和應用想必會更深更廣。



1.1.2 兩性分子的堆積參數和自組裝形態

兩性分子是具有親水端和疏水端（親油）的化合物，在傳統的兩性分子中，親油部分通常由長烴鏈（hydrocarbon chain）組成（飽和或不飽和），而親水部分可以是離子的或非離子的，非離子親水基團通常為聚醚（polyether）或多羥基單元（polyhydroxyl units）；陰離子（anionic）親水基團通常為羧酸鹽（carboxylate）、硫酸鹽（sulfate）、磺酸鹽（sulphonate）和磷酸鹽（phosphate）；陽離子（cationic）親水基團通常為四級銨鹽（quaternary ammonium）。由於它們兩性（amphiphilicity）的性質（或表面活性），兩性分子中極性頭端與水相互作用，而非極性親脂鏈將在界面上移動（或是在空氣中和在非極性液體中），在這種情況下，破壞界面處的內聚能有利於兩性分子的分散相與選擇性溶劑之間的微相分離（microphase separation），形成許多較小的封閉界面或微胞狀聚集體。由於它們降低表面張力的能力，兩性分子通常稱為表面活性劑（surfactants）。因此，兩性分子在眾多應用中，如乳化劑、洗滌劑、分散劑、潤濕和發泡劑等扮演很重要的角色。^{24,25}

兩性分子自組裝成超分子結構的形狀和尺寸取決於分子本身的幾何形狀和濃度，還有溶液條件，如溫度、pH 值和離子強度等，其中以親水和親油部分相對體積比為決定自組裝形態和尺寸之最要因素。根據 Israelachvili 所提出的臨界堆積參數（critical packing parameter, C_{pp} ）可以預測自組裝的結構形態，²⁶ 而此參數與兩性分子本身之關係式為 $C_{pp} = V / (a_0 l_c)$ ，其中 V 是聚集核心中疏水鏈佔有的有效體積， a_0 是親水頭端在聚集界面處的有效表面積， l_c 是整體分子的最大有效長度（臨界鏈長度）。若 $C_{pp} < 1/3$ 時，兩性分子傾向形成球狀微胞（spherical micelles）；若 $1/3 < C_{pp} < 1/2$ 時，傾向形成圓柱狀微胞（cylindrical micelles）；若 $1/2 < C_{pp} < 1$ 時，傾向形成球狀囊泡（spherical vesical）；若 $C_{pp} = 1$ 時，傾向形成平面雙層（planar bilayer）；若 $C_{pp} > 1$ 時，則傾向形成反微胞（reversed micelle）的聚集，如圖 1-2 所示。¹⁸ 控制形狀提供了開發和操縱奈米結構的可能性。以這種方式發展出許多功能系統，可以在不同的科學領域找到廣泛的技術應用。

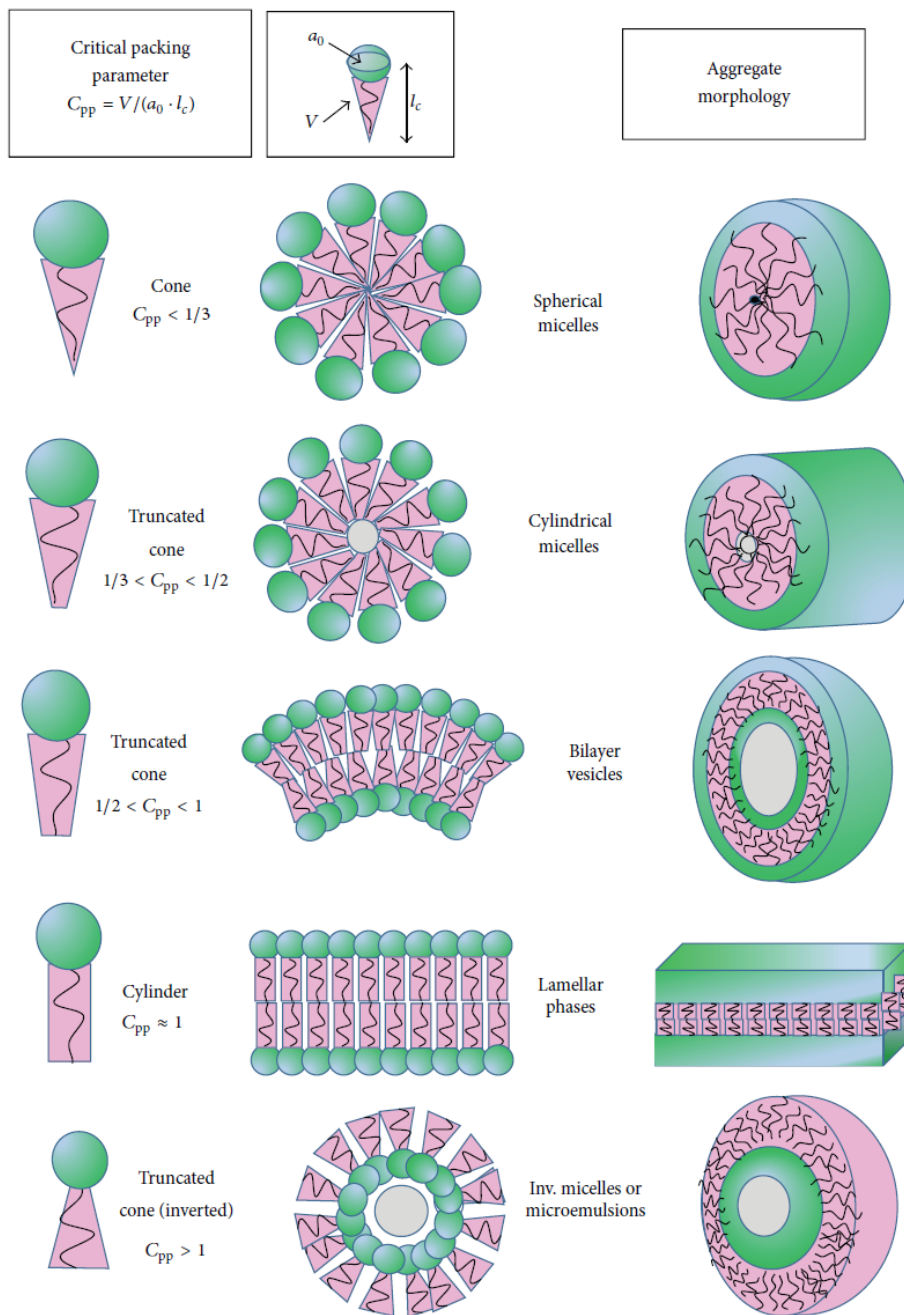


圖 1-2 可由臨界堆積參數 C_{pp} 預測兩性分子自組裝的結構形態。¹⁸

1.1.3 胜肽 (peptide) 兩性分子所形成之自組裝結構

由於自然界存在的胺基酸擁有多樣性側鏈結構，故許多兩性分子皆引入胺基酸形成胜肽兩性分子 (peptide amphiphile, PA)，其包含兩個部分：具有不同長度的脂肪族疏水性尾端和通過胜肽鍵連接尾端的親水性胜肽序列。在過去二十年中，已經發展出許多能夠自組裝成微米和奈米尺寸結構的胜肽系統，所形成自組裝結

在中性 pH 下在水中會形成奈米管狀和奈米囊狀結構，如圖 1-4 (b) 所示。不同 glycine 尾巴長度對於奈米結構形態會有不同的影響，但因 glycine 骨架彼此之間還存在氫鍵作用力，造成自組裝過程較為複雜，故影響程度較無規律性，所形成之超結構也較難預測。

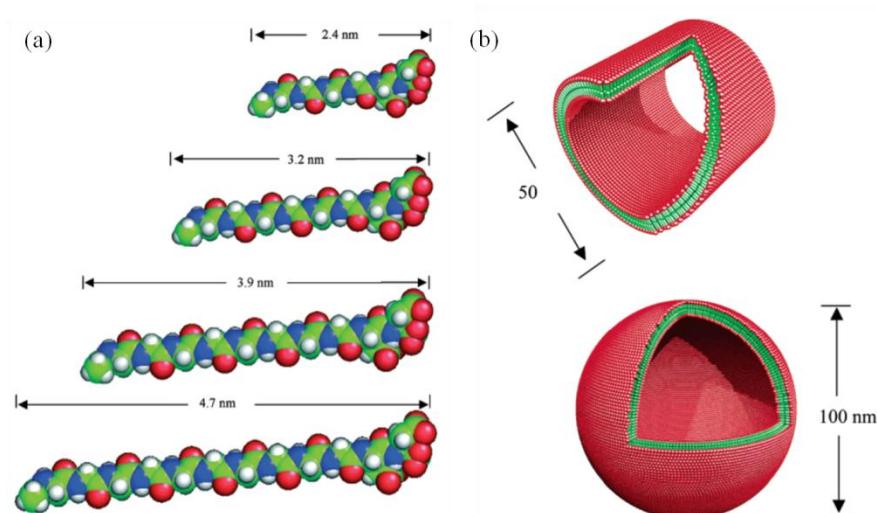


圖 1-4³⁰ (a) 胜肽單體 G_nD_2 之 3D 空間分佈分子模型 (綠色為碳，白色為氫，紅色為氧，藍色為氮)，由上到下分別為 G_4D_2 、 G_6D_2 、 G_8D_2 和 $G_{10}D_2$ ，而分子長度範圍從 G_4D_2 2.4 nm 至 $G_{10}D_2$ 4.7 nm。(b) G_nD_2 自組裝形成奈米管狀 (上) 和奈米囊狀 (下) 結構模型示意圖 (結構模型直徑分別為 50 和 100 nm)，glycine 為被包覆在雙層結構內部遠離水的綠色部分，aspartic acids 為外層暴露於水中之紅色部分。

1.1.4 尿素 (urea) 建構單元所形成之自組裝結構

在化學，生物化學和材料科學領域的許多應用中，了解非共價力如何引導自組裝和折疊結構的形成和穩定性，這一點至關重要。³¹ 特別令人感興趣的是定向力 (directional forces)，例如氫鍵和金屬-配體相互作用 (metal-ligand interaction)，其可以預測地將分子組裝成特定結構，包括籠狀 (cages)，膠囊狀 (capsules) 和棒狀 (rods) 等。³² 尿素 (urea) 可以通過其兩個-NH 質子作為氫鍵供體，亦可通過羰基 (C=O) 的孤對電子作為氫鍵受體，彼此之間良好的互補性導致自身結合成穩定持

久的一維氫鍵鏈 (one-dimensional hydrogen-bonded chains)，如圖 1-5 (a) 所示。³³ 尿素-尿素氫鍵作用力被證明是可靠且可預測的自組裝驅動力。1990 年 Etter 教授及其研究團隊最先通過 X 射線晶體學 (X-ray crystallography) 確認尿素的堆疊模式，並製定了一套預測其組裝模式的經驗指南。³⁴ Lauher 和 Fowler 教授及其研究團隊巧妙地設計出二維氫鍵網絡，³⁵ 通過羧酸和尿素基團兩者之間的互補性，合成了一系列由尿素氫鍵鏈和羧酸二聚體正交連接形成的層狀結構，如圖 1-5 (b) 所示。Wuest 教授及其研究團隊報導了由尿素-尿素氫鍵組裝成的三維骨架，³⁶ 通過仲丁基 (sec-butyl) 取代的四個尿素組成一具手性的分子，組裝形成四方多孔 (tetragonal porous) 結構，如圖 1-5 (c) 所示。

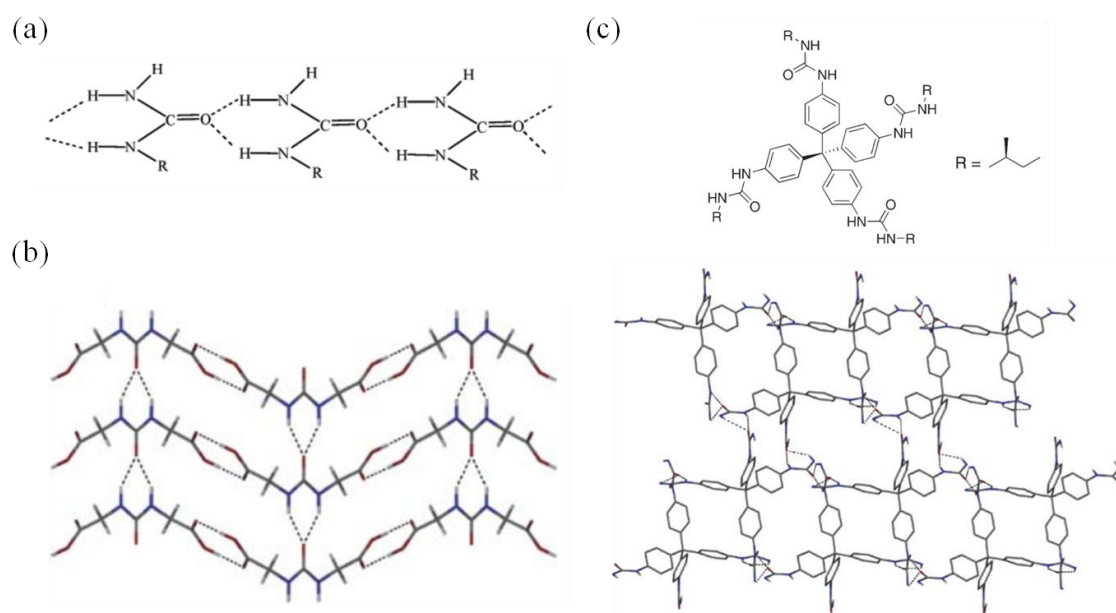


圖 1-5 (a) 尿素一維氫鍵鏈結構。³³ (b) 由尿素氫鍵鏈和羧酸二聚體正交連接形成的二維層狀結構。³⁷ (c) 上圖為仲丁基取代的四個尿素組成一具手性分子之結構，下圖為手性分子由尿素-尿素氫鍵組裝成的三維四方多孔結構。³⁷

由於尿素-尿素之間可形成一、二、三維的氫鍵網絡，藉由使用不同數量或調整尿素所在位置等方法，可以建構出許多可預測的自組裝結構，目前尿素建構單

位已被用於製造柱狀 (columns)、絲狀 (fibers)、片材 (sheets)、膠帶 (tapes)、膠囊狀 (capsules) 和凝膠狀 (gels) 等結構。^{37,38} 而有另一群研究者是將尿素引入 (incorporate into) 一個簡單的建構單元，由兩個尿素基團和兩個 C 形 (C-shape) 間隔鏈 (spacer) 組成一大環雙尿素 (macrocyclic bis-urea) 分子，³⁹ 藉由兩個相反平行的尿素分子提供建構單元間氫鍵作用力，自組裝形成一空心柱狀 (pillars) 結構，如圖 1-6 所示，^{37,40} 而圖中也列出一些較具代表性的大環雙尿素分子和這些分子間藉由氫鍵自組裝成空心柱狀之結構。而這種多孔材料已被證明可用作吸附劑、分離載體或反應模板，也適用於奈米流體、催化和儲存活性物質如氣體和試劑。³⁹

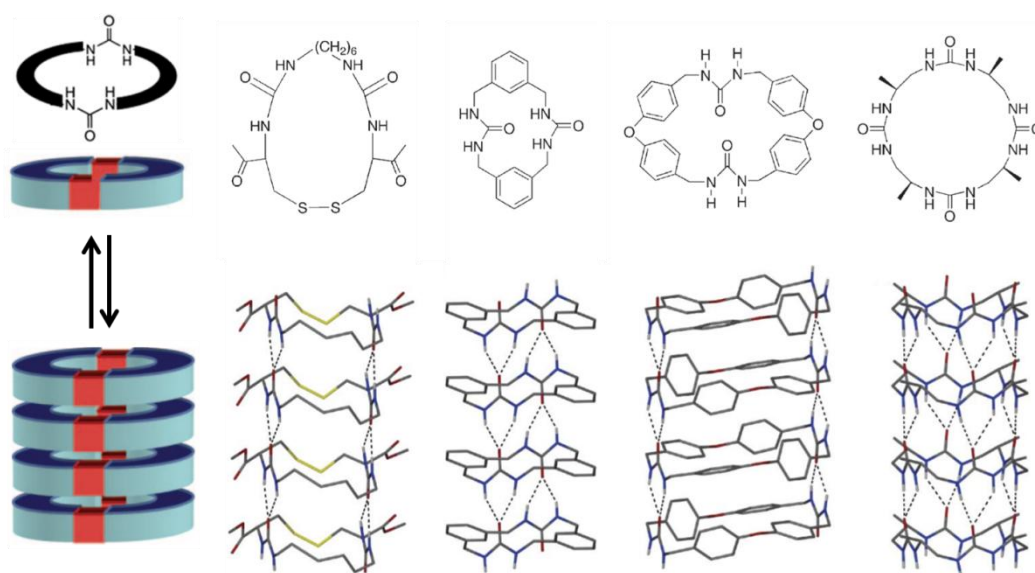


圖 1-6 大環雙尿素建構單元 (左上) 與自組裝形成空心柱狀結構 (左下) 示意圖。一系列代表性的大環雙尿素分子結構 (右上) 和其所對應的自組裝結構 (右下) 示意圖。^{37,40}

1.1.5 生物活性建構單元所形成之自組裝結構及其應用

具有生物活性功能分子的超分子奈米結構已被積極探索，並可作為生物技術領域中有希望的材料。這類生物材料如此受歡迎的主要原因是它們為奈米尺寸，從生物系統的角度來看，奈米等級的物體比大部分細胞都小得多，尺寸上相似於亞細胞組分 (蛋白質和 DNA)、細胞器 (粒線體、溶酶體、核糖體和細胞骨架) 和

微生物 (病毒)。而大部分真核細胞的直徑約在數十微米左右，因此這些亞微米等級的生物材料可被看做生物奈米結構。也因為他們很小，奈米尺度結構研究已成為增長最快的科學領域之一，此結構在許多領域中的應用潛力也是無限的。

具有生物活性的合成奈米結構是由功能性的建構單元體 (functional building block，亦即組成的化合物) 組裝而成，而此建構單元體包含三部分：具有生物活性部分 (bioactive function segment)、自組裝部分 (self-assembling segment) 和連接這兩部份之連接鏈 (linker)。不同的建構單元體於水溶液中可藉由單一非共價鍵作用力或其組合自組裝成不同形態的奈米結構，如奈米片狀 (nano-sheet)、 β -帶狀 (β -ribbon)、囊狀 (vesicle)、微胞狀 (micelle) 與圓柱狀 (cylinder) 等，如圖 1-7 所示。⁴¹ 這種由下而上 (bottom-up) 的自組裝過程，可將眾多的生物功能性分子分散至奈米結構表面上，具有多價效應 (multivalent effect, MVE)。多價效應通常定義為與單個生物活性分子給出的貢獻總和相比，多個生物活性分子連接到同一骨架上之單位化合物所引起的生物反應較大，舉例來說，若單一分子所能達到的抑制作用為 1，四個單一分子單獨作用之抑制作用為 4，但接在同一骨架上之四個單一分子的抑制作用卻為 200，如圖 1-8 所示。⁴²

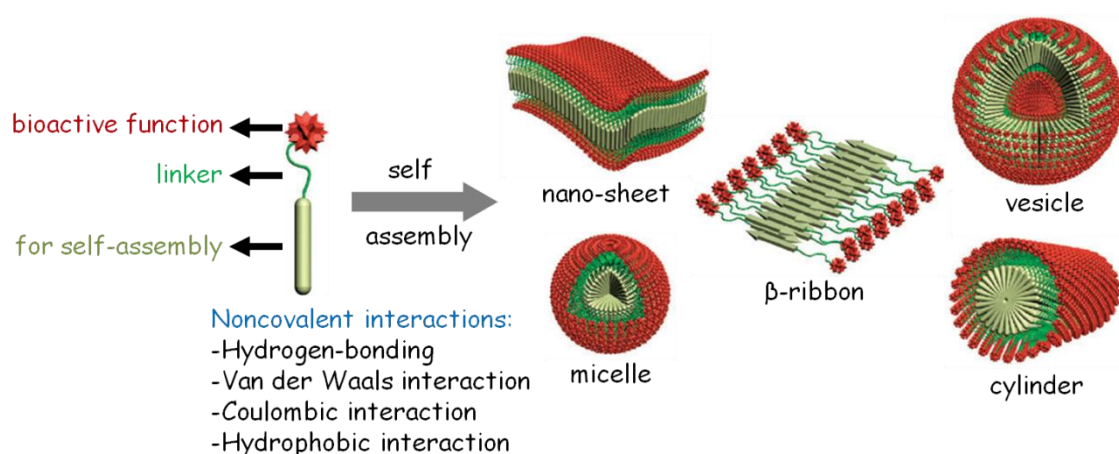


圖 1-7 具有生物活性功能分子組成 (上端紅色為具有生物活性之基團，中端綠色為連接鏈，下端橄欖綠為自組裝功能基團) 和其藉由非價作用力自組裝成不同的奈米結構示意圖。⁴¹

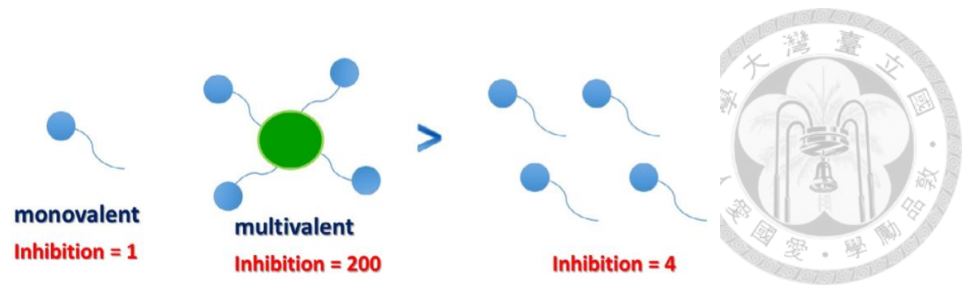


圖 1-8 多共價效應示意圖。⁴²

依據不同生物活性的需求，可將建構單元體中生物活性部分置換成不同基團，如多肽 (polypeptide)、蛋白質 (protein) 和碳水化合物 (carbohydrates) 等。2010 年 Hamachi 教授及其研究團隊將會和蛋白質結合的配體 (ligand) 作為生物活性部分，螢光團作為自組裝部分，改變不同配體或螢光團，形成一系列能偵測特定蛋白質之 turn-on 螢光探針。⁴³ 螢光單體在水溶液中會聚集成螢光團朝內的自組裝結構，此時螢光團因聚集而造成螢光淬滅 (signal off)，當配體和目標蛋白藉由蛋白質-配體作用力 (protein-ligand interaction) 結合時，會使自組裝結構崩解導致螢光增強 (signal on)，如圖 1-9 所示。這些具有自組裝功能之超結構不僅可以運用在蛋白質偵測上，也可以運在小分子偵測、藥物傳遞或基因傳遞等生物領域上。

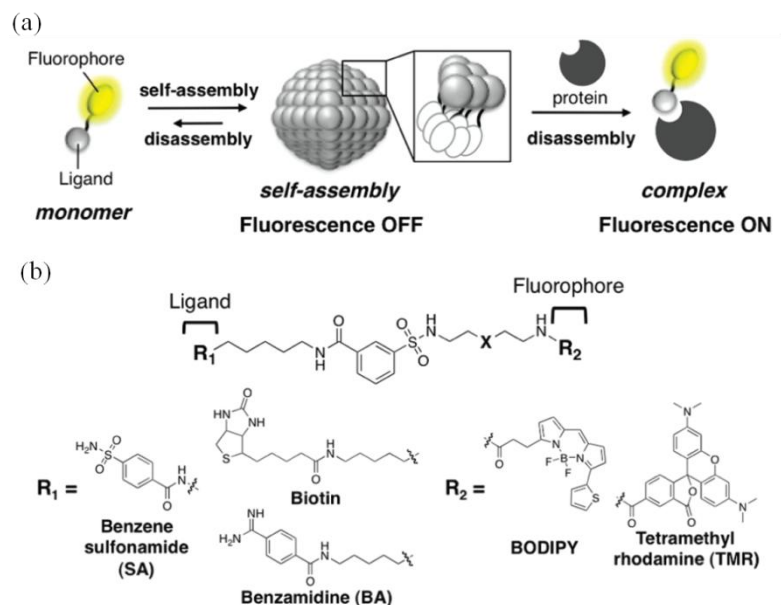


圖 1-9⁴³ (a) 自組裝 turn-on 螢光探針偵測特定蛋白之感測機制示意圖。(b) 一系列蛋白質螢光探針之分子結構。



1.2 類固醇之簡介與其自組裝之應用

除了前面章節提及含有胺基酸和尿素基團之自組裝結構外，也可以利用具有生物相容性之類固醇作為建構單元體中自組裝部分，形成許多不同型態之超結構。類固醇為自然存在之分子，存在於所有動植物中，並且在生物系統中扮演許多重要的角色，且類固醇分子傾向聚集的特性，能廣泛的應用在自組裝材料當中。

1.2.1 類固醇結構和種類

類固醇 (steroids) 是廣泛分佈於生物界一大類重要的有機分子之總稱，存在於植物、動物與菌類中，其種類繁多且功能各異，但均具有環戊烷多氫菲 (cyclopentanoperhydrophenanthrene) 的共同基本結構，是由三個六碳環己烷 (A、B、C 環) 和一個五碳環戊烷 (D 環) 組成的十七個碳之環狀化合物，此種四環核心的結構與環上各原子的標號法如圖 1-10 (a) 所示。各種類固醇化合物主要區別在環的立體化學、環中雙鍵、羥基或其他官能基的分佈，以及 17 號位置上的不同側鏈 (R)。3 號位置上通常有羥基或酮基，18 號位置的碳並非類固醇所共有。環戊烷多氫菲上含有六個立體中心 (stereocenter)，各取代基與碳環之間以及環與環間均可有不同的立體結構，A/B 環之間可為順式 (*cis*) 或反式 (*trans*) (唯一例外是雌性激素分子 A 環是芳香環為一平面結構)，而 B/C、C/D 環均以反式為主，如圖 1-10 (b) 所示，其中以所有立體中心均為反式的異構物 (*all-trans* isomer) 最為常見，結構較具平面性 (planarity) 與剛性 (rigidity)。⁴⁴

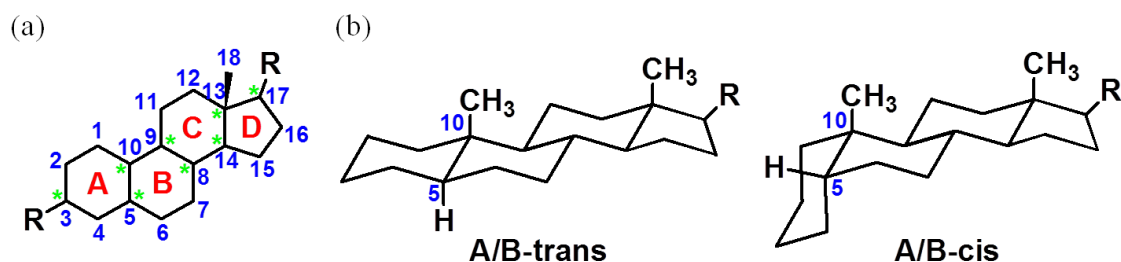


圖 1-10 (a) 類固醇結構與碳數編號。(b) 類固醇中 A/B 環為反式或順式之結構。

類固醇 (steroid) 是屬於脂類的一種，現時從植物、動物及真菌中確認的有數以百種的類固醇。在人類生理及藥理上，最重要且最為人熟知的類固醇是膽固醇，其在細胞的多項功能中擔任不可或缺的角色，作為構成動物細胞膜的普通元素，也是脂溶性維生素與類固醇荷爾蒙的前驅物。大部分類固醇均由膽固醇轉化而來，不同的激素，包括脊椎動物的性激素，都是由膽固醇建立的類固醇。在血液中，類固醇負責運送蛋白質，但在生物系統中，類固醇最重要的角色是作為激素，類固醇激素與其受體蛋白質結合以產生生理反應，引發基因轉錄及細胞功能的改變。類固醇激素依功能主要區分為三類：⁴⁵

(1) 腎上腺皮質素 (adrenocortical hormones)：又分為糖皮質激素 (glucocorticoid) 和礦物皮質激素 (mineralocorticoids)。糖皮質激素主要調節新陳代謝及免疫系統，也是醫院常用的抗發炎藥物之成分，而礦物皮質激素則是維持血液量及控制腎臟排出電解質。

(2) 性激素 (sex hormones)：又分為雌性激素 (female sex hormones；estrogens) 和雄性激素 (male sex hormones；androgens)，主要功能是控制人體第二性徵之發育。

(3) 神經類固醇 (neurosteroids)：主要在腦部合成，影響許多腦部的功能，包括神經內分泌 (neuroendocrine) 和行為能力。⁴⁶

於女性身體合成之雌性激素又分三種，分別為雌激素酮 (estrone, E₁)、雌二醇 (17β-estradiol, E₂)、雌三醇 (estriol, E₃)，結構如圖 1-11 所示，其中又以雌二醇活性最強，雌激素酮和雌三醇均為雌二醇之代謝產物

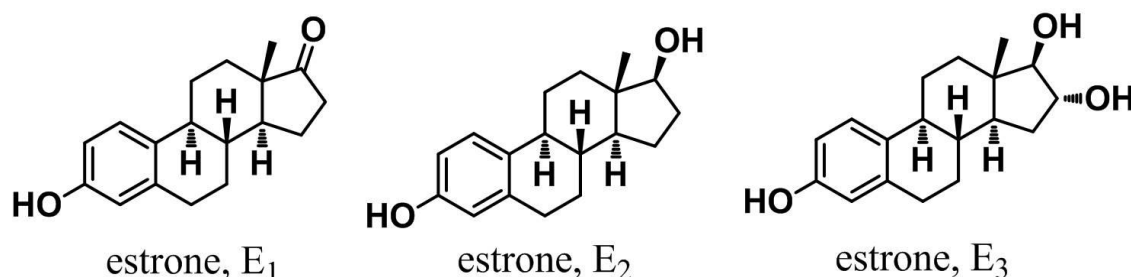


圖 1-11 具生理活性之雌性激素結構。



1.2.2 類固醇衍生物之自組裝介紹

類固醇是廣泛存在的天然物，不僅具有生物相容性，其分子本身平面性、剛性與疏水性結構有助於類固醇之間的堆疊，藉由偶極-偶極作用力 (dipole-dipole interaction) 和凡得瓦力，形成類固醇-類固醇堆疊結構，⁴⁷ 若在四環核心上修飾其他官能基能增加分子間的作用力 (通常為氫鍵或 π - π 堆疊)，或改變分子整體極性，會影響形成聚集的自組裝方式。⁴⁸ 其中以類固醇中之膽固醇為基礎的自組裝材料最被廣為研究。

1989 年 Weiss 教授及其研究團隊首位合成以膽固醇為基礎的低分子量化合物，⁴⁹ 由修飾過的連接鏈 (linker, L) 連接芳香環 (aromatic moiety, A) 和類固醇 (steroidal group, S) 組成一具有自組裝能力的分子系統 (ALS)，此後便有大量研究投入此系統中，甚至衍生出此系統二聚體 ($A(LS)_2$) 或連接鏈兩端皆為類固醇基團 (LS_2) 的分子結構，如圖 1-12 所示。

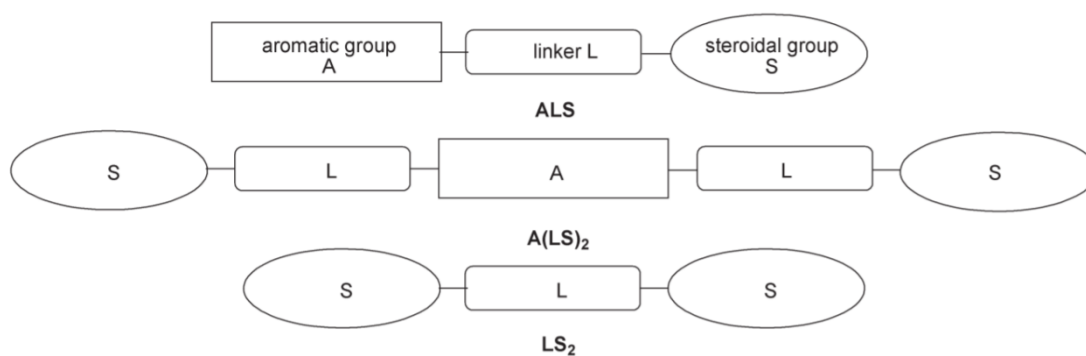


圖 1-12 以膽固醇為基礎的分子 ALS、 $A(LS)_2$ 和 LS_2 組分示意圖。⁴⁹

雙組分 (two-component) 自組裝系統近來越來越受到關注且發展迅速，這個領域的第一次嘗試在 1990 年代末期被報導，他們主要是基於宿主-客體 (host-guest) 複雜的相互作用來顯著地改變組分的自組裝能力。⁴⁸ 現今，該領域更傾向研究分子的自組裝能力可以通過向系統中添加其他分子來進行微調，而兩個分子的相互作用還是以氫鍵為主，但當然也可以其他作用力作為自組裝的驅動力或輔力，如 π - π

堆疊或靜電作用力等。2009 年 Yue 教授及其研究團隊利用 1-萘胺鹽酸鹽 (1-naphthylammonium chloride, NA) 和脫氧膽酸鈉 (sodium deoxycholate, NaDC) 形成一離子自組裝 (ionic self-assembly, ISA) 系統,⁵⁰ 如圖 1-13 (a) 所示, 兩個分子具有相反電荷的親水端, 可以通過庫倫吸引力結合, 而系統親水性會因為形成 NA-DC 錯合物而下降, 再藉由 NADC 分子類固醇骨架的疏水性和骨架上兩個羥基形成的氫鍵網絡, 在低溫 (5 °C) 水溶液環境中會自發形成固體樣囊泡 (solid-like vesicles), 如圖 1-13 (b) 所示, 隨著溫度增加囊泡狀結構會轉變為奈米帶 (nanobelts) 結構, 如圖 1-13 (c) 所示。因此, 通過簡單地改變 ISA 系統中不同的構建模塊, 可以發展出許多不同結構和功能的獨特有機-無機奈米材料。

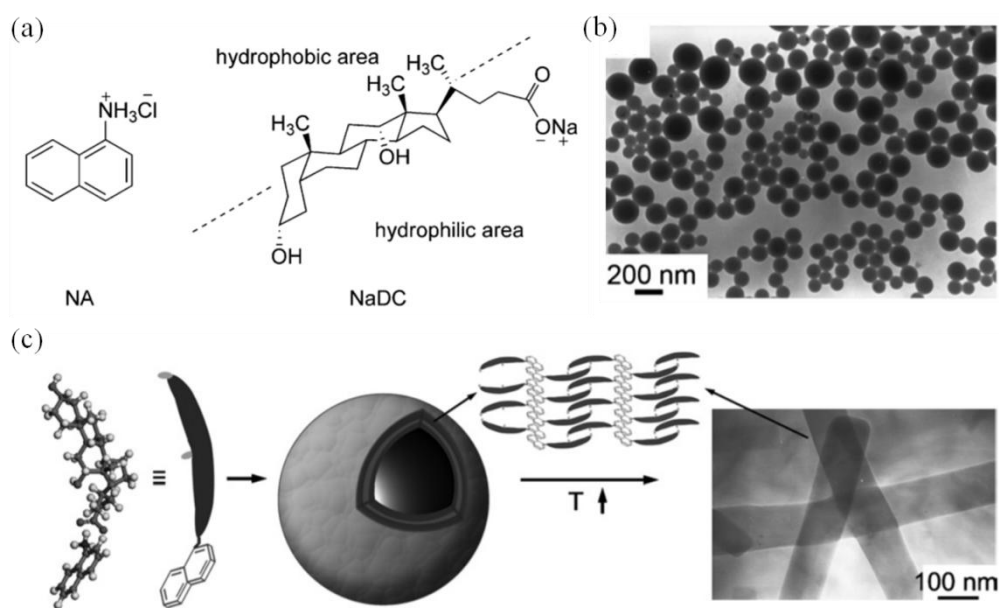


圖 1-13 (a) NA 和 NADC 分子結構圖。(b) NA 和 NADC 分子於 5 °C 下自組裝結構之 TEM 圖。(c) ISA 系統自組裝模式示意圖和 NA 和 NADC 分子於室溫下自組裝結構之 TEM 圖。⁵⁰

除了分子本身結構會影響自組裝結構外, 通過改變分子本身所在環境條件, 如溶劑組成、溫度、pH 變化、金屬配位、光照射等也可以調控分子自組裝。2016 年 Yang 教授及其研究團隊發表的分子 POM-Chol,⁵¹ 在不同溶劑組成下會有不同



的自組裝結構，在 DMF/Toluene 溶劑中為三維絲狀網絡 (3D fibrous network) 結構；在 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 溶劑中為散亂短絲狀 (short fibrils) 結構；在 Acetone 溶劑中為奈米片狀 (nanosheets) 結構，如圖 1-14 所示。

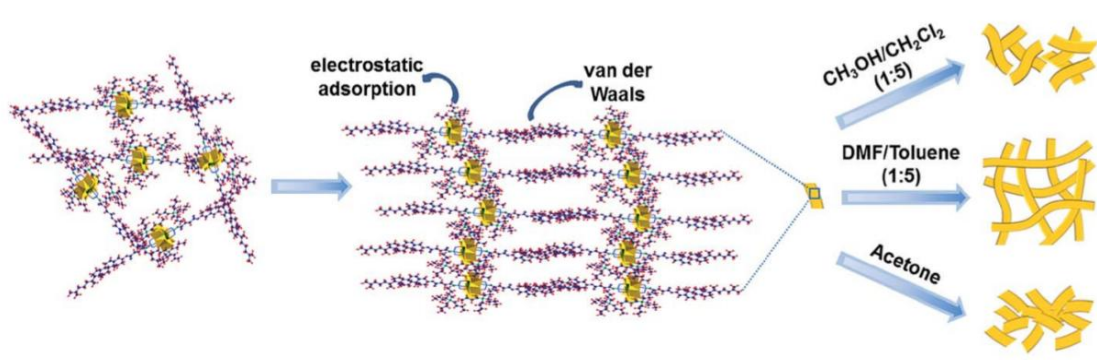


圖 1-14 在不同溶劑組成下 POM-Chol 分子自組裝結構示意圖。⁵¹

類固醇結構於自組裝領域上亮眼的表現，但以雌性激素為基礎的分子自組裝研究卻很少，將類固醇分子修飾上螢光團並藉由螢光變化來觀察超分子結構生成之研究更是少之又少，這引發我們的興趣並著手於雌性激素螢光衍生物自組裝的研究，相信雌性激素分子較為平面的結構會使得分子更容易自組裝形成超分子結構。

1.3 比例 (ratiometric) 螢光團偵測機制

螢光常做為探測或顯像的工具，因螢光訊號具有高靈敏度 (sensitivity)、高特异性 (specificity)、時空解析度 (temporal-spatial resolution) 佳等優點，在化學、生物、醫藥或是其他領域上都有廣泛的運用。而螢光輸出種類分為單或雙放射峰兩種輸出方式，^{52,53} 單放射峰 (single-emission) 螢光輸出是以單波長螢光做為感測依據，但其螢光強度往往容易受到所使用的感測分子濃度、分析物濃度或儀器的光源強度等因素影響，或者會因為螢光染劑降解、光漂白 (photobleaching) 而造成訊號的誤差，且當分析物濃度極低時，也不易判斷螢光強度的變化。因此，為了克

服上述問題，可以使用雙放射峰 (double-emission) 螢光輸出的方式，利用兩個峰螢光強度的比值 (ratiometric) 達到自我校正 (self-calibration) 的功能。要達到雙放射峰螢光輸出的方式有幾種機制，⁵⁴ 分別為激發態分子內電荷轉移、^{55,56} 激發態分子內質子轉移、^{57,58} 螢光共振能量轉移、^{55,56,59,60} 單體-激態附體之形成等，^{55,56} 以下就針對這幾種機制做介紹，並舉例說明如何應用。

1.3.1 激發態分子內電荷轉移 (Excited-state intramolecular charge transfer, ESICT)

以 ESICT 機制為基礎的探針，其特徵為在同一個分子內含有給電子單元和接受電子單元，這兩個單元以共軛的方式連接，在激發態時產生推-拉 (push-pull) 的 π 電子系統，常用於陽離子感測上，當陽離子和給電子單元有交互作用，會使得探針給電子能力下降，造成分子整體能階提升，HOMO 因受到陽離子穩定而上升幅度較小，而 LUMO 能階上升較多，能階差變大，造成吸收或放射光譜藍位移 (blue shift)；相反的，當陽離子和接受電子單元有交互作用，會使得探針接受電子能力上升，造成分子整體能階下降，LUMO 因受到陽離子穩定而下降幅度較大，而 HOMO 能階下降較少，能階差變小，造成吸收或放射光譜紅位移 (red shift)，如圖 1-15 所示。

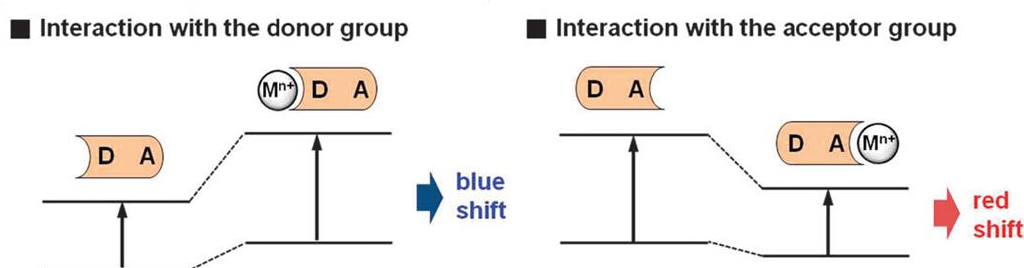


圖 1-15 以 ICT 機制為基礎的探針之給電子基團或接受電子基團與陽離子結合後，能階差異與光譜偏移示意圖。⁵⁴

1.3.2 激發態分子內質子轉移 (Excited-state intramolecular proton transfer, ESIPT)

ESIPT 機制通常發生在激發態時，螢光團中的羥基 (-OH) 或胺基 (-NH₂、-NH) 的質子快速轉移至羰基 (C=O) 的氧或亞胺 (C=N) 的氮原子上。舉例來說，2-(2'-羥基苯基)苯並噁唑 (2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazole, **HBO**) 在基態時傾向以烯醇 (enol, E) 的形式存在，通過分子內六圓環氫鍵穩定其能階，當以 320 nm 波長作激發，激發態的烯醇 (E^{*}) 形式相對不穩定，故會進行分子內質子轉移，將分子轉換為激發態的酮互變異構物形式 (keto tautomer, K^{*})，並以此形式放出較長波長的光 (500 nm) 回到基態 (K) 後，再進行反向質子轉移回到較穩定的烯醇形式，而部分受激發的分子並未走 ESIPT 路徑，而以烯醇激發態形式放光回到基態，則此放射光波長較短 (430 nm)，在許多情況下，ESIPT 螢光團都會存在烯醇形式或酮形式的放射峰，而透過這兩個放射峰相對強度的變化，可以做為比例感測系統的依據，如圖 1-16 所示。

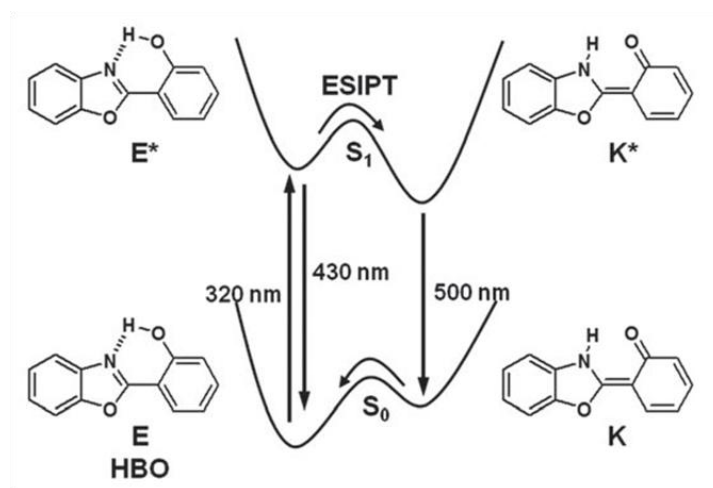


圖 1-16 以 **HBO** 分子為例的 ESIPT 機制圖。⁵⁴

1.3.3 螢光共振能量轉移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)

FRET 機制中通常含有兩個螢光團，其中一個放射波長較短作為給予光子角色 (donor)，另一個放射波長較長作為接受光子角色 (acceptor)，當供體螢光團被激發，

其放射出的能量會以非輻射形式傳遞至受體並被受體吸收，最後以受體螢光形式釋放能量，如圖 1-17 (a) 所示。待與分析物作用後，FRET 機制會消失，只會放射出供體螢光團之螢光，如此一來，螢光強度就會有一消一長的變化，達到比例變化的目的。在螢光共振能量轉移系統，供體的放射光譜和受體的吸收光譜必須部分重疊，如圖 1-17 (b) 所示，且供體是透過空間 (through space) 將能量傳遞給受體，故兩個螢光團之間的距離會受到限制，經文獻報導，兩者之間距離須須介於 0.1-10 nm 之間，⁶¹ 除此之外，供體放射和受體吸收的偶極矩位向 (orientation of dipole moment) 要相符合，才有辦法進行能量的傳遞。

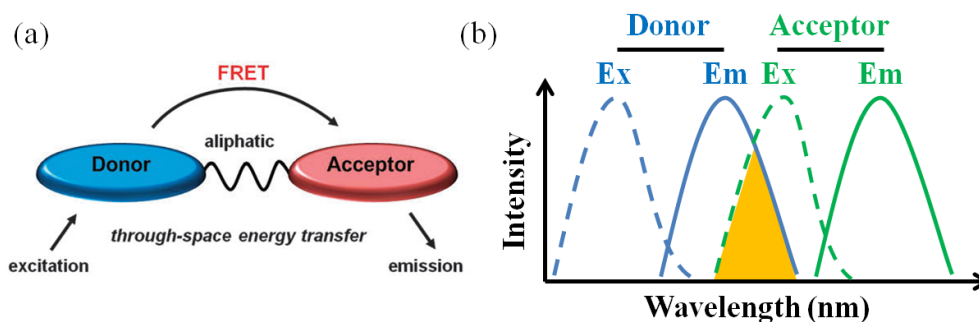


圖 1-17 (a) (b) 供、受體吸收和放射光譜圖。左邊藍色為供體，右邊綠色為受體，虛線為吸收光譜，實線為放射光譜，中間橙色區域表示供體放射光譜與受體吸收光譜重疊部分。

1.3.4 單體-激態附體之形成 (Formation of monomer-excimer)

單體 (monomer) 指的是單獨的螢光團，激態複體 (excimer) 是 excited dimer 的縮寫，表示激發態螢光團的二聚體。在單體-激態複體系統中，基本要件為至少要含有兩個或兩個以上的螢光團，而形成激態複體的反應機構有兩種：一是單體受光激發後，由基態躍遷至激發態，由於分子間作用力，激發態螢光團會吸引基態螢光團，當一對螢光團的 π 軌域重疊而產生激態複體，此種方式稱為動態的激發複體 (dynamic excimer)；另一種是一對螢光團在基態時靠近而成為具有物理作用的二聚體，吸光後直接躍遷形成此二聚體的激發態，此時激態複體能階較高，

因此會進行結構重組降低能階，此種方式稱為靜態的激態複體 (static excimer)。因激態複體之能階差較小且沒有振動能階，所以螢光放射光譜之波長較單體長，峰寬也較寬，如圖 1-18 (a) 所示。⁶² 最常見用來形成激態複體的螢光團為芘分子 (pyrene)，其單體放射峰波長位於 370-380 nm，激態複體放射峰波長則位於 460-480 nm。Schmuck 教授及其研究團隊曾在 2012 年發表以芘分子為基礎的胜肽信號 (peptide beacon) 探針 **18**，⁶³ 並會與雙股 DNA 作用，作用前探針分子為摺疊形式並放出激態複體的螢光 (490 nm)，與 DNA 結合後造成結構上的改變，兩個堆疊的芘分子被拆散並放出單體的螢光 (406 nm)，監測這兩個放射峰的相對強度 (F406 / F490)，可以比例的方式感測核酸，如圖 1-18 (b) 所示。

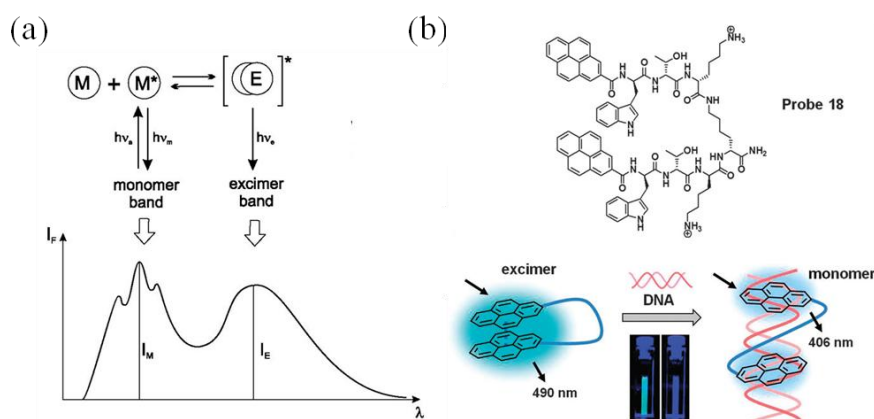


圖 1-18 (a) 單體與激態複體螢光放射光譜之比較。⁶² (b) 上圖為探針 **18** 分子結構；下圖為探針 **18** 應用於比例感測 DNA 示意圖。⁵⁴

1.4 3-羥基黃酮 (3-Hydroxyflavone, 3-HF) 螢光團之介紹

在 1-3 章節已經介紹過許多比例螢光的放射機制，有利用單一螢光團與分析物反應前後造成波長變化，來達到比例螢光的目的；也有利用同一個分子內，有兩個不同放射波長的螢光團，來達到比例螢光的目的，但不同的螢光團即使在相同環境中，也會有不同驟熄 (quenching) 效果及光分解效應 (effect of photodegradation)，使得無法達到自我校正之功能，故最理想的方法是選用於不同波長具有兩個以上放射峰的單一螢光團，利用不同波長-螢光比例之變化來達到自



我校正之效果，其中 3-羥基黃酮 (3-hydroxyflavone, **3-HF**) 螢光團便擁有此特性，其結構如圖 1-19 所示。

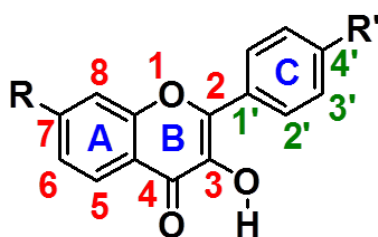


圖 1-19 3-羥基黃酮之結構。

1.4.1 3-Hydroxyflavone 雙螢光放射機制

Kasha 教授及其研究團隊於 1979 年最先開始研究 3-hydroxyflavone 的螢光性質，⁶⁴ 此螢光團具有雙螢光放射峰，兩個放射峰分別由激發態分子內電荷轉移 (excited state intramolecular charge transfer, ESICT) 與激發態分子內質子轉移 (excited state intramolecular proton transfer, ESIPT) 提供。而 Demchenko 教授及其研究團隊於 2010 年發展出可用於 3-hydroxyflavone 光譜解迴旋 (deconvolution) 的演算系統，並對此分子進行更仔細的分析。⁶⁵ 其螢光放射機制由 3-hydroxyflavone 衍生物 4'-diethylamino-3-hydroxyflavone (**FE**) 作示範，若在非質子性溶劑中 (aprotic solvent)，**FE** 分子受激發後其電子從 normal 的基態 (N) 躍遷至激發態 (N^{*})，此時因為分子本身的性質，3 號位置羥基上的氫會進行質子轉移 (proton transfer) 至 4 號位置的羰基上，形成分子的互變異構體 (tautomer)，電子也會轉移至能量較低的 tautomer 激發態 (T^{*})，隨後放出綠色螢光回到 tautomer 基態 (T)，而此放射峰即稱為 ESIPT 放射峰，最後在歷經鬆弛後回到 normal 的基態 (N)，而部分未進行質子轉移的電子則會從 normal 的激發態 (N^{*}) 放出藍色螢光回到 normal 的基態 (N)，而此放射峰即稱為 ESICT 放射峰。Brown 教授及其研究團隊指出 3-hydroxyflavone 激發態分子內質子轉移 (ESIPT) 之半生期短於 35 飛秒 (femtosecond)，相對於其他系統而言是非常快速的，故常溫下 3-hydroxyflavone 螢光主要由 ESIPT 路徑提供。

⁶⁶ 而若在質子性溶劑中 (protic solvent), 4 號位置上的羰基會和溶劑中的質子形成分子間的氫鍵, 產生能階比 normal 基態略低的 normal-hydrated 基態 (N-H), 分子受激發後躍遷至 normal-hydrated 激發態 (N^*-H), 此時 ESIPT 路徑被溶質-溶劑間分子間氫鍵競爭, 而以 normal-hydrated 激發態 (N^*-H) 回到 normal-hydrated 基態 (N-H), 放出波長較 ESICT 長的螢光, 如圖 1-20 所示。

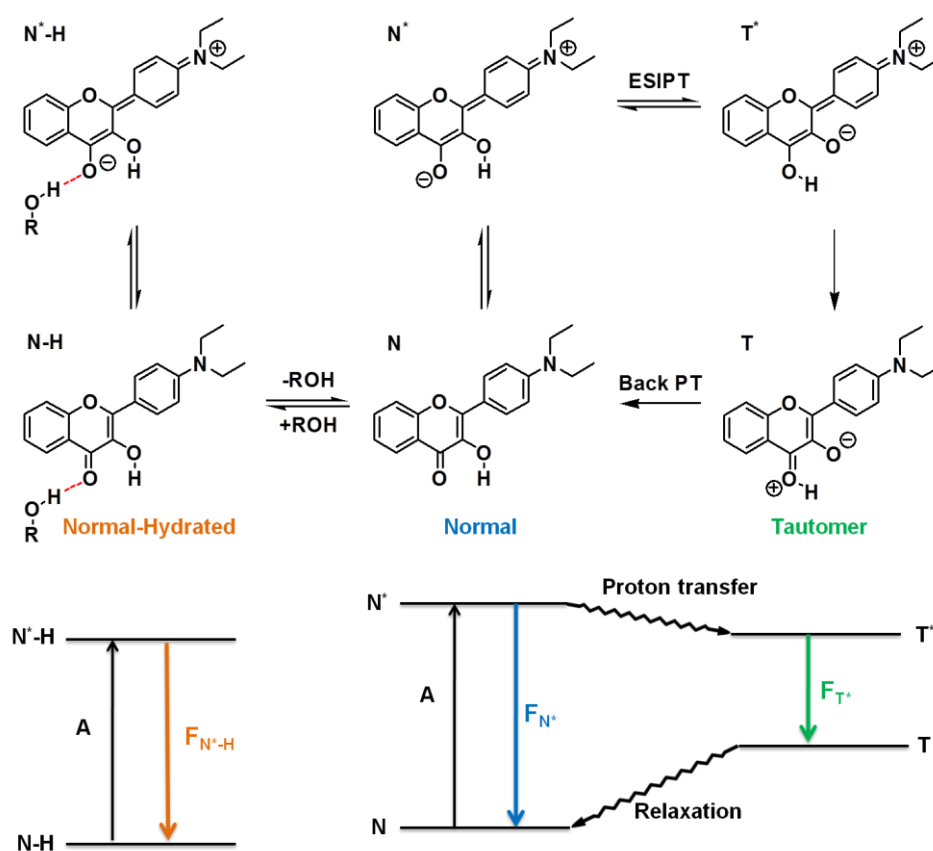


圖 1-20 3-羥基黃酮衍生物之螢光放射機制示意圖。

由上述 deconvolution 的演算系統中可知, 3-hydroxyflavone 衍生物 **FE** 擁有兩個可被激發之基態 (N, N-H), 與三個螢光放射峰 (N^* 、 N^*-H 、 T^*), 而 N^*-H 放射峰落在 N^* 與 T^* 放射峰之間, 如圖 1-21 (a) 所示。隨著溶劑極性上升, N^* 放射峰隨之增加; 而隨著介質中水的比例上升, N^*-H 放射峰的訊號強度也逐漸增, 通常 N^*-H 與 N^* 兩個峰產生的螢光放射在光譜上會大部分重疊而不易區分, 因此在應用上除非有特定因素, 不然均將兩峰之重疊當作一放射峰, 稱之為 ESICT 放射峰, 如圖

1-21 (b) 所示。若擁有多參數回應之螢光團放射峰間距過近，於自我校正時雖然不同波峰會有消長變化，但大幅度的重疊會使其效果不彰。**FE** 之 **ESICT** 與 **ESIPT** 這兩個放射峰距離遠，免除了重疊之疑慮，可將比例螢光之優點完全發揮。

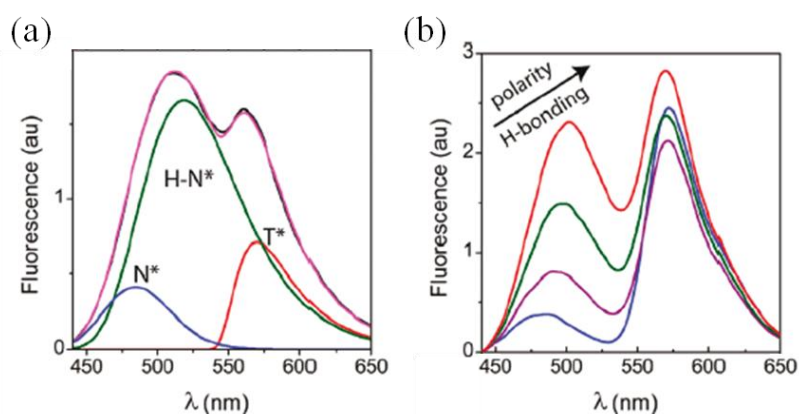


圖 1-21 (a) **FE** 分子的螢光訊號經解迴旋分解成 N^* 、 N^*-H 、 T^* 三個峰 (藍色為 N^* 峰、紅色為 T^* 峰、綠色為 N^*-H 峰、紫色為 N^* 、 N^*-H 、 T^* 三個峰之總合)。(b) **FE** 分子螢光放射隨不同溶劑極性或含氫鍵程度而變化示意圖。⁶⁷

1.4.2 3-Hydroxyflavone 衍生物之應用

3-hydroxyflavone 衍生物近年來已被廣泛的運用在螢光感測器與探針上，此螢光團具有以下優點：(1) 相較酵素免疫分析法中，使用昂貴的抗體連結酵素免疫複合體，3-hydroxyflavone 螢光團為有機化合物，具有成本低廉、穩定性高等特色。(2) 相較於大部分高螢光產率的螢光團是以單一螢光變化來做偵測，3-hydroxyflavone 衍生物具有兩種螢光放射路徑，受環境極性影響大而有相對比例的變化，可達到自我校正之效果，具有更高的可信度。

1993 年 Kelley 教授及其研究團隊，直接利用 **ESICT/ESIPT** 螢光放射強度比例變化，探測未知溶劑環境極性大小；⁶⁸ 2002 年 Klymchenko 教授及其研究團隊，曾透過延長共軛長度或修飾其他官能基，來改變 3-hydroxyflavone 螢光放射的波長位置，增加此螢光團的應用性；^{69,70} 同年 Suzuki 教授利用金屬與 3-hydroxyflavone 上的羥基和羰基之結合強弱，來辨識金屬離子；⁷¹ 又 3-hydroxyflavone 對環境中質子

給予基團非常敏感，故可用於偵測水合能力。⁷² 除此之外，3-hydroxyflavone 亦是廣泛應用於生物方面之測試，如偵測生物膜 (biomembrane) 之偶極潛力 (dipole potential)；⁷³ 利用改變脂肪酸組成、極性端 (polar head)、溫度與膽固醇比例來偵測磷脂質雙層 (phospholipid bilayer) 分布位置之性質。⁷⁴ 近幾年則將此螢光團應用在生物體內半胱氨酸 (cysteine) 的偵測上，在 3 號位置羥基修飾上會和 cysteine 反應的官能基，藉由反應前後 ES IPT 路徑被阻擋與否，達到偵測的目的。^{75,76}

1.5 以苯併呔嗪 (benzofurazan) 為骨架的螢光團之介紹

由於其靈敏度和選擇性，結合螢光檢測的高效液相層析 (HPLC) 已成為測定未知物最有效的工具之一。然而大多數分析物均不含螢光，因此需要用各種螢光衍生化試劑進行分析物衍生化或化學轉換，使檢測方法可以更廣泛的應用在其他分析物上。⁷⁷ 為此目的，到目前為止已經發展出許多螢光衍生化試劑，^{78,79} 並可以將它們分為兩類，一種是由高螢光部分和標記部分組合成的「螢光標記 (fluorescent tagging)」或「標記試劑 (labeling reagent)」，其和分析物上的官能基反應後會形成螢光標記衍生物；另一種是「螢光試劑 (fluorogenic reagent)」，其本身沒有螢光，和分析物反應後會產生螢光的衍生物，可避免螢光試劑本身的螢光干擾，故螢光試劑優於螢光標記。而以苯併呔嗪 (benzofurazan) 為骨架的化合物是常見的螢光試劑，如 NBD、DBD、ABD、SBD 等，其結構如圖 1-22 (a) 所示。

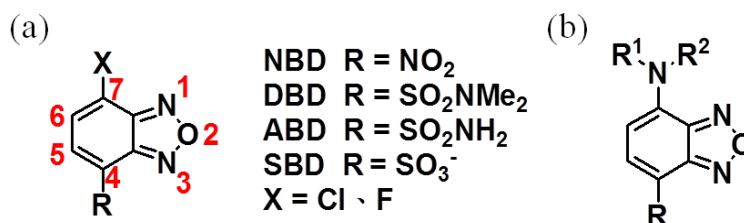


圖 1-22 (a) 常見以 benzofurazan 為骨架的螢光試劑之結構圖。(b) 螢光試劑之胺類螢光衍生物結構圖。



1.5.1 以 benzofurazan 為骨架的螢光團之螢光特性

以 benzofurazan 為骨架的螢光試劑常和一級或二級胺類反應形成胺類螢光衍生物，其結構如圖 1-22 (b) 所示。1986 年 Heberer 和 Matschiner 兩位教授及其研究團隊首次研究了以 benzofurazan 為骨架的螢光衍生物之吸收特性，⁸⁰ 而其螢光特性則首次在 1991 年由 Lin 和 Struve 教授發表，⁸¹ 在這兩者的研究中均發現在極性溶劑中，吸收和螢光波長都有紅移 (bathochromic) 的現象，而螢光強度則大幅下降，原因如圖 1-23 所示，⁸² 分子在基態 (S^0) 時偶極矩 (dipole moment) 較小，當吸收適當光子能量躍遷至激發態時 (S^1)，分子本身電子供體 (electron-donating group) 胺基和電子受體 (electron-accepting group) 如硝基 (nitro)、磺胺基 (sulfonamide)、磺酸酯基 (sulfonate) 之間會有電荷轉移，導致分子內電荷分離使偶極矩增加，⁸³ 而電子激發過程比原子核運動還來得快，⁸⁴ 在皮秒 (picosecond) 的時間尺度上，溶劑分子會重新定向形成秩序度較高的排列，以適應分子較大的偶極矩，這種溶劑鬆弛 (solvent relaxation) 的現象會降低激發態的能階，同時基態的能階也因較不穩定而上升，進而縮小兩者之間的能階差，當系統最終透過螢光放射回到基態，螢光放射光子的波長會比最初吸收的光子還長。而溶劑鬆弛的程度會隨著溶劑極性增加而增加，故螢光放射波長會隨著溶劑極性增加而紅移，此現象又稱正溶劑化顯色 (positive solvatochromism)。在一些情況下，分子透過自發放熱 (非輻射) 的方式回到基態的過程 (k_{nr}) 會和螢光放射路徑作競爭，而許多 solvatochromic fluorophore 的共同特徵是隨著 S^0 和 S^1 之間的能階差變小，非放射性的衰變 (non-radioactive decay) 會越來越顯著，這種作用尤其在極性質子溶劑中 (如，水) 最為明顯，導致螢光量子產率下降，螢光強度大幅下降。不過也有其他研究認為是因為分子上 2 號位置得氧和水產生分子間氫鍵，才造成螢光下降的現象。⁸⁵ 由於螢光衍生物之吸收和螢光特性會受溶劑極性影響，故這些螢光衍生物可歸類為溶劑變色螢光團 (solvatochromic fluorophore)。

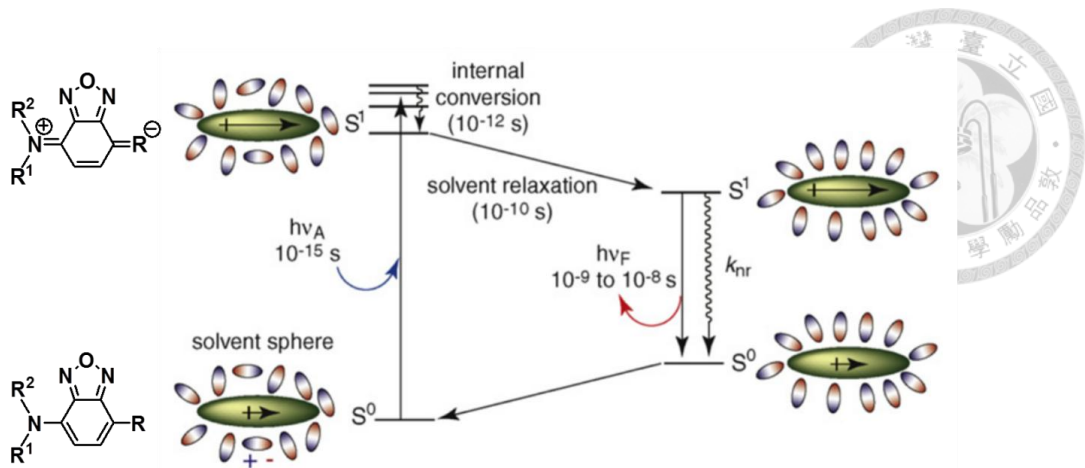


圖 1-23 solvatochromic 效應對螢光影響示意圖。⁸²

1.5.2 以 benzofurazan 為骨架的螢光團之應用

以 benzofurazan 為骨架的螢光團具有以下優點：⁸⁶ (1) 螢光特性受環境極性影響大。(2) 量子產率 (quantum yield, Φ) 高。(3) 激發和放射波長較長，若運用在生物體內，可避免生物體自體螢光的干擾。雖然此種螢光團為單螢光放射輸出，其螢光強度容易受種種外在因素所影響，而不像前一章節介紹的 3-hydroxyflavone 有雙螢光放射峰，具有自我校正之功能，但單螢光放射相較雙螢光放射，其放光機制較為單純，且因其對環境敏感的特性，使得這些螢光團也早已被廣泛的運用在螢光感測器與探針上。早期常應用於溫度應達型螢光感測高分子，近年來則應用在配體探針 (ligand-based probe) 上選擇性辨識蛋白質。

2003 年 Uchiyama 教授及其研究團隊在 LCST 高分子中，引入一系列以 benzofurazan 為骨架的螢光團作為螢光輸出訊號的來源，⁸⁷ 如圖 1-24 所示。在低溫時高分子溶於水中，螢光團處於較親水的環境，螢光強度弱；當溫度提升後，高分子間作用力提升，導致螢光團處於較疏水的環境，螢光強度大幅提高，藉由觀察螢光強度的變化達到溫度感測目的。

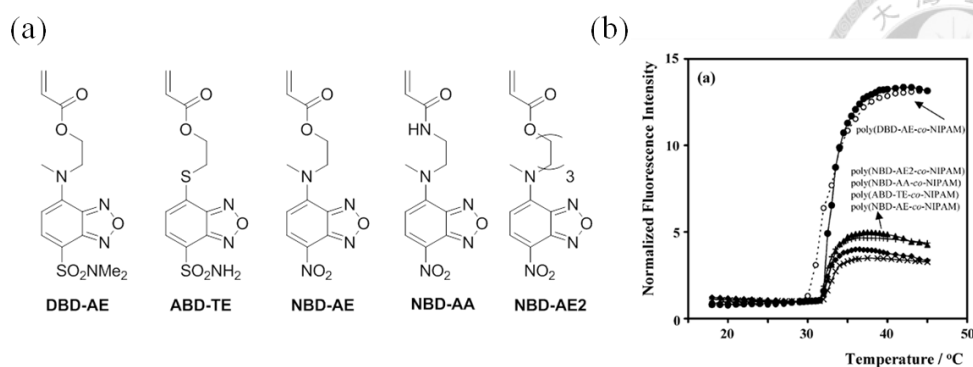


圖 1-24 (a) 含聚合雙鍵官能基之苯併呋嗪衍生物。(b) 不同溫度應答螢光高分子最強放射螢光強度對溫度作圖。分別為 **PNIPAM** 修飾 **DBD-AE** (●)、**NBD-AE2** (▲)、**NBD-AA** (+)、**ABD-TE** (◆)、**NBD-AE** (x) 以升溫模式測量以及 **DBD-AE** (○) 以降溫模式測量。⁸⁷

2013 年陳貴通教授及其研究團隊將以 benzofurazan 為骨架的不同螢光團，修飾在會和目標蛋白質結合的配體 (ligand) 上，形成一系列偵測特定蛋白質之螢光探針。⁸⁸ 其感測機制為配體會與蛋白質中的特定疏水部位的結合，由於環境敏感的螢光團鄰近疏水環境造成螢光強度大增，而在沒有目標蛋白質的情況下，環境較為親水使得螢光強度很低，藉由螢光的 turn-on 來選擇性辨識目標蛋白，如圖 1-25 所示。

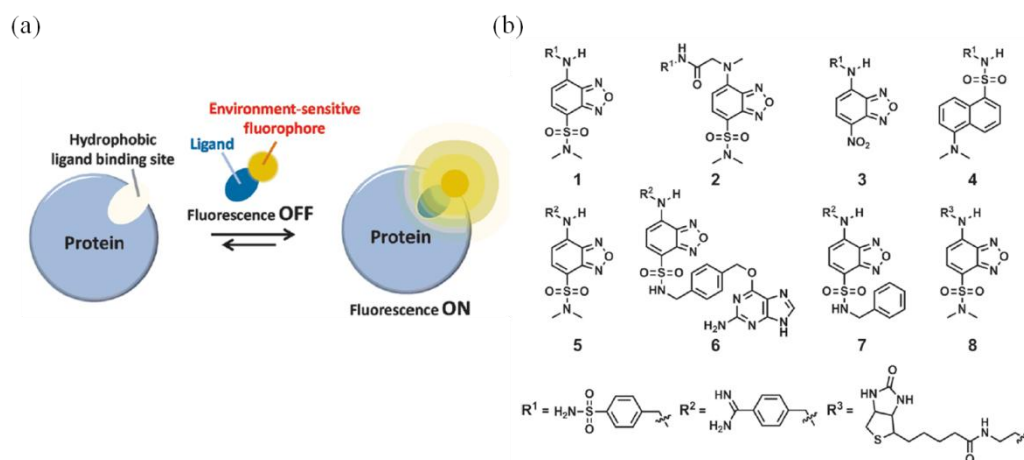


圖 1-25 (a) 蛋白質螢光探針感測機制示意圖。(b) 一系列偵測特定蛋白質螢光探針之分子結構。⁸⁸



1.6 實驗室相關研究

本實驗室余柔靚學姊在 2009 年曾合成出一系列 **3-HF** 衍生物之雌二醇螢光探針，⁸⁹ **HF-EDIOL**、**HF-EDINH₂**、**HF-EDISO₄H** 和 **HF-7 α -EDIOL**，其結構如圖 1-26 所示 (藍色)，並研究其用於生物體內的雌性激素受體 (estrogen receptor) 之造影的可能性，希望藉由 **3-HF** 的螢光特性，來偵測雌性激素受體的存在位置及濃度變化，提供即時檢測的工具。其研究結果意外發現這四個分子在水占比例比較高的環境中會進行自組裝，形成螢光團在內，雌性激素分子朝外的超分子結構。為了更加了解雌性激素結構之自組裝機制，與其結構上的改變對自組裝之影響，實驗室蘇怡文學姊在 2011 年合成出一系列分子，**HF-3-EDIGuid**、**HF-3-EDICO₂H** 和 **HF-7-EDISO₄H**，其結構如圖 1-26 所示 (橘色)，想要進一步探討置換不同的高極性官能基團，或改變螢光團連接位置 (改變分子形狀)，是否會影響分子的堆疊，導致不同的自組裝型態。⁹⁰

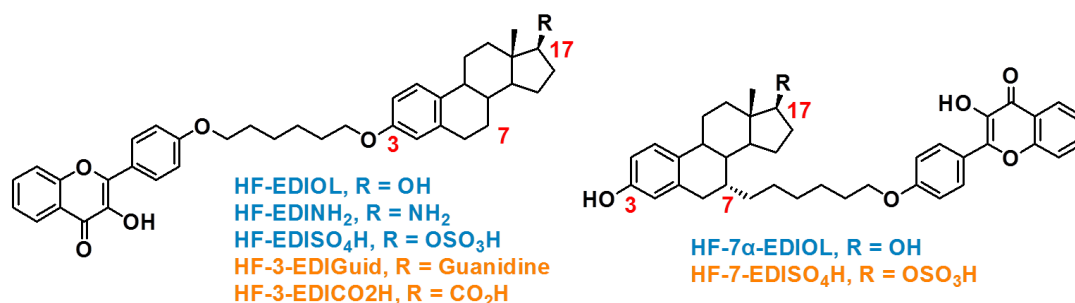



圖 1-26 **HF-EDIOL**、**HF-EDINH₂**、**HF-EDISO₄H**、**HF-7 α -EDIOL**、**HF-3-EDIGuid**、**HF-3-EDICO₂H** 與 **HF-7-EDISO₄H** 之結構圖 (藍色為余柔靚學姊分子，橘色為蘇怡文學姊分子)。

將 **HF-EDIOL**、**HF-EDINH₂**、**HF-EDISO₄H**、**HF-7 α -EDIOL**、**HF-3-EDIGuid**、**HF-3-EDICO₂H** 與 **HF-7-EDISO₄H** 分子分別配製成濃度為 10 μ M，在不同的 DMSO 與 H₂O 比例之混合溶劑進行螢光定性測試，而 **3-HF** 螢光團的螢光特性在 1.4 章節裡已經介紹過，已知該螢光團具有 ESICT 與 ES IPT 兩種放光機制，在極性非質子



性溶劑中 (polar aprotic solvent)，如 DMSO，以 ESIPT 螢光放射為主，隨著水的比例增加，因質子溶劑的存在，ESIPT 路徑會被水競爭掉，使得其放射峰隨之下降，而 ESICT 放射峰則隨之上升，但由圖 1-27 (a-g) 螢光光譜發現這些分子，隨水的比例增加，ESICT 放射峰先升後降，ESIPT 放射峰先降後升，均有反轉的現象發生，代表在高極性混合溶劑下分子形成螢光團在內的自組裝結構，使得螢光團周圍環境發生改變，造成此反轉現象。

綜合兩者螢光定性測試結果，發現雌二醇末端官能基帶電性會影響分子在水中之溶解度，在相同連接螢光團方式的情況下，雌二醇 17 號位置為高極性帶電基團 (-COOH、-OSO₃H、-NH₂)，其分子對水溶解度較好，且單就水溶性而言，分子水溶性越佳，越能容忍以自由的狀態存在於水溶液中而不易聚集，因此在較低比例 DMSO 水溶液才會發生反轉，依螢光光譜上反映出的 ESICT/ESIPT 比值大小與不同比例 DMSO 水溶液關係圖中，**HF-3-EDICO₂H**、**HF-EDIOL**、**HF-7 α -EDIOL**、**HF-EDINH₂**、**HF-EDISO₄H**、**HF-3-EDIGuid** 與 **HF-7-EDISO₄H** 發生轉折之 DMSO 水溶液濃度分別為 70%、60%、50%、50%、40%、20%、20%，如圖 1-27 (h)，趨勢大致符合上述所敘，除 **HF-3-EDICO₂H** 分子因本身自組裝能力優異，呈相反結果。另外加上螢光衍生物於 5 % DMSO 水溶液中的螢光表現 (ESICT 或 ESIPT 主導)，可排序出七種螢光衍生物在水中傾向聚集的程度依序為 **HF-3-EDICO₂H** > **HF-EDIOL** > **HF-7 α -EDIOL** = **HF-EDINH₂** > **HF-EDISO₄H** > **HF-3-EDIGuid** > **HF-7-EDISO₄H**。螢光分子在水中傾向聚集的程度不僅與溶解度有關，更與分子的自組裝能力密切相關。

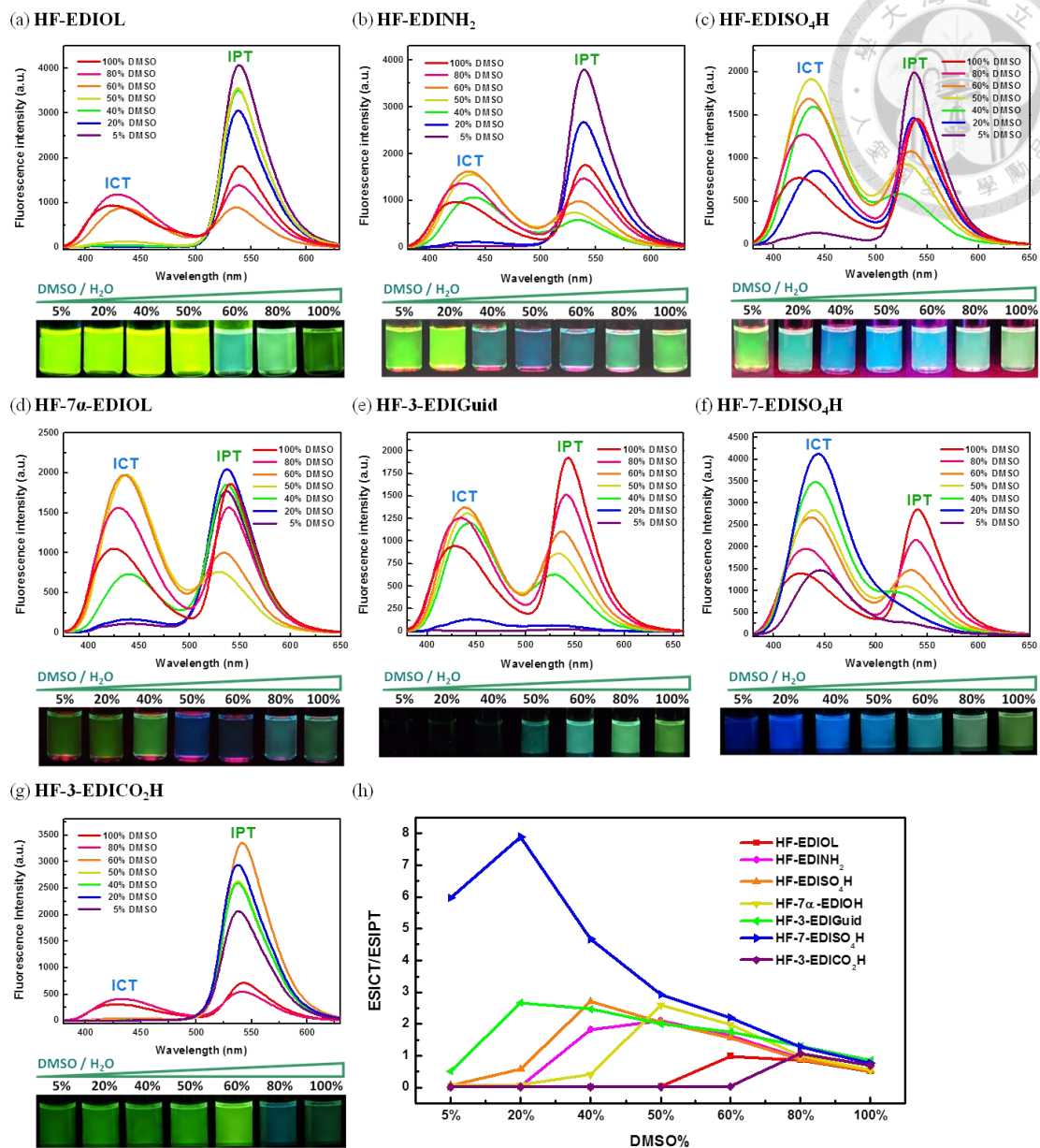
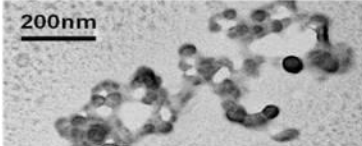
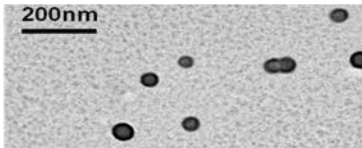
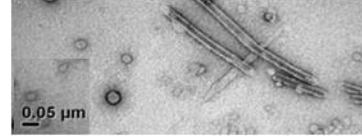
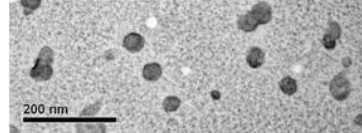
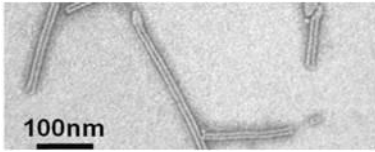
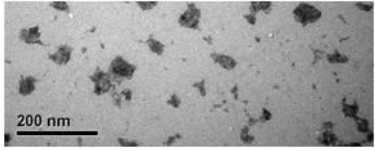

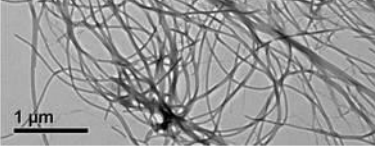


圖 1-27 (a-g) 上圖分別為 HF-EDIOL、HF-EDINH₂、HF-EDISO₄H、HF-7 α -EDIOL、HF-3-EDIGuid、HF-3-EDICO₂H 與 HF-7-EDISO₄H (10 μ M) 在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之螢光光譜， $\lambda_{\text{ex}} = 354$ 、355、359、359、356、362、357 nm， $\text{slit}_{\text{ex}} \& \text{slit}_{\text{em}} = 5$ nm (HF-3-EDICO₂H 之 slit_{ex} , $\text{slit}_{\text{em}} = 2.5, 5$ nm)。 (a-g) 下圖為相對應之螢光顯像圖，由左至右 DMSO 濃度分別為 5%，20%，40%，50%，60%，80%，100%。 (h) HF-EDIOL、HF-EDINH₂、HF-EDISO₄H、HF-7 α -EDIOL、HF-3-EDIGuid、HF-3-EDICO₂H 與 HF-7-EDISO₄H (10 μ M) 在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之 ESICT/ESIPT 比例圖。^{89,90}

經由 DLS、Zeta potential、TEM 之超結構型態鑑定實驗結果整理如表 1-2 所示，DLS 實驗結果為 **HF-EDIOL**、**HF-7 α -EDIOL**、**HF-EDINH₂**、**HF-3-EDIGuid**、**HF-EDISO₄H**、**HF-7-EDISO₄H** 與 **HF-3-EDICO₂H** 在 5% DMSO 水溶液中皆有形成一定大小的聚集。Zeta potential 的量測結果為 **HF-EDINH₂** 和 **HF-3-EDIGuid** 表面電位為正；**HF-EDISO₄H**、**HF-7-EDISO₄H** 與 **HF-3-EDICO₂H** 表面電位為負，進一步證明分子是以螢光團朝內，雌二醇朝外的結構進行堆積。最後由 TEM 量測結果得知超分子結構型態，若雌二醇 17 號位置為羥基 (-OH)，聚集結構為球狀，如 **HF-EDIOL** 和 **HF-7 α -EDIOL**；若為高極性帶電基團 (-COOH、-OSO₃H、-NH₂)，聚集結構為柱狀或絲狀，如 **HF-3-EDICO₂H**、**HF-EDISO₄H**、**HF-EDINH₂**。雌二醇末端官能基不僅會影響分子在水中之溶解度，也會影響分子堆疊的形態。

表 1-2 **HF-EDIOL**、**HF-7 α -EDIOL**、**HF-EDINH₂**、**HF-3-EDIGuid**、**HF-EDISO₄H**、**HF-7-EDISO₄H** 與 **HF-3-EDICO₂H** (200 μ M) 之超結構型態鑑定綜合整理表。⁹⁰

	DLS (nm)	Zeta (mV)	TEM	Diameter (nm)	螢光 表現
HF-EDIOL (5% DMSO)	64.9	0		60~70	ESIPT
HF-7α-EDIOL (5% DMSO)	67.8	0		60~70	ESIPT
HF-EDINH₂ (5% DMSO)	102.0	+61.1		~21	ESIPT
HF-3-EDIGuid (5% DMSO)	27.0	+48.7		33~43	ESIPT

HF-EDISO₄H (5% DMSO)	81.2	-69.9		~25	ESIPT
HF-7-EDISO₄H (5% DMSO)	152.5	-57.2		30~50	ESIPT
HF-3-EDICO₂H (5% DMSO)	48.6	-54.5		20~30	ESIPT
HF-3-EDICO₂H (60% DMSO)	213.8	-8.53		~23	ESIPT



第二章 雌二醇螢光分子之合成



實驗室先前的研究中發現，具有 **3-HF** 螢光團的雌二醇衍生物會形成特殊形態的聚集，也進一步討論了於雌二醇 3 號和 17 號位置換不同高極性官能基團，或改變螢光團連接位置（改變分子形狀）對於自組裝形態的影響。大部份的文獻也是在類固醇的四環核心上作修飾，來增加分子間作用力或改變分子整體極性，進而影響分子的自組裝方式。有鑑於此，促使我們想要進一步探討，若在 linker 而非聚集本體-雌二醇上做修飾，是否也會影響分子的堆疊模式。文獻中有許多例子於結構中引入甘胺酸 (Gly) 和尿素 (U) 基團來幫助分子自組裝（詳見 1.1.3 和 1.1.4 章節），故我們將 Gly 和 U 這兩個親水性基團修飾在 linker 上，除了希望藉由官能基上的質子供體與質子受體來增加和水之間的氫鍵作用力，提升分子在水中之溶解度，也希望藉由增加分子和分子之間的氫鍵作用力，增強自組裝過程中的驅動力，使分子可以堆疊得更有次序或更加緊密。由於分子聚集前後周圍環境的極性會有變化，故將一環境敏感的螢光團連接在分子上，其螢光輸出訊號會隨周圍環境極性的變化即時的作出回應，透過螢光特性的變化，可即時得知分子所處的環境並初步判斷分子的聚集與否。

2.1 HF-7 α -Gly-EDIOL 、 HF-7 α -U-EDIOL 、 DBD-7 α -Gly-EDIOL 、 DBD-7 α -U-EDIOL 之分子設計

我們所設計的一系列探針 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 是由修飾過的連接鏈 (linker, L) 連接芳香環 (aromatic moiety, A) 和類固醇 (steroidal group, S) 組成，如圖 2-1 所示。

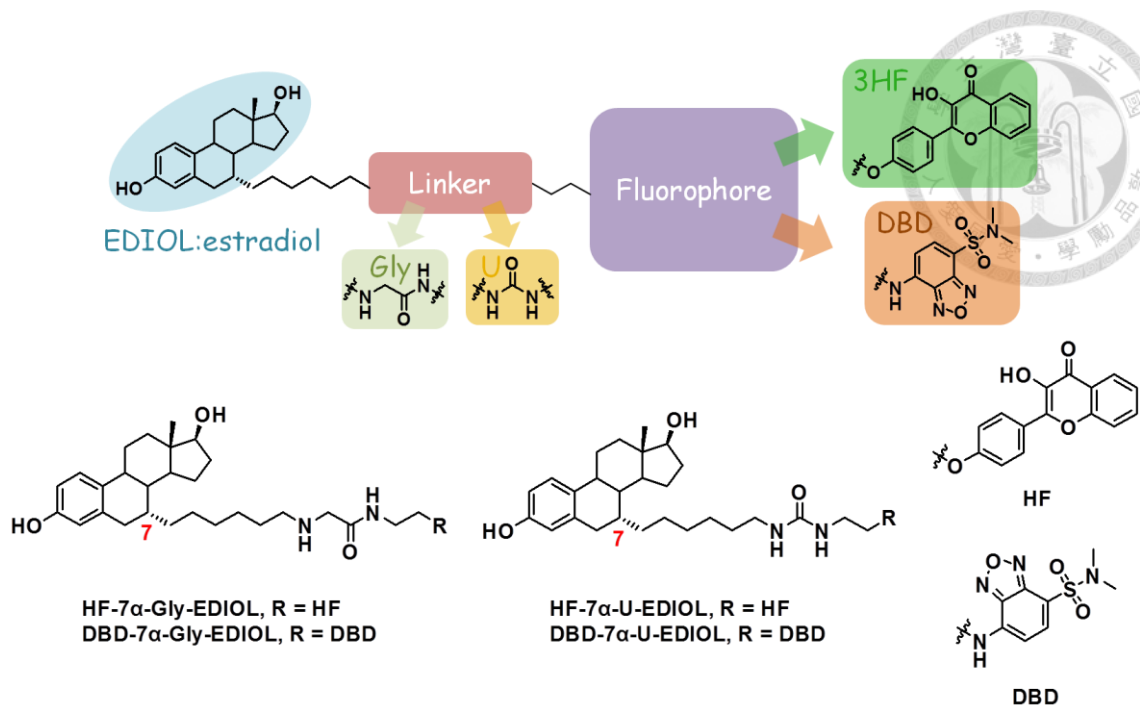


圖 2-1 HF-7 α -Gly-EDIOL、HF-7 α -U-EDIOL、DBD-7 α -Gly-EDIOL 和 DBD-7 α -U-EDIOL 之分子結構設計與分子結構圖。

類固醇部分是造成分子聚集的主因，目前類固醇結構於超分子自組裝中扮演重要角色，能提供自組裝所需的疏水作用力，其中以眾類固醇的前驅物-膽固醇 (cholesterol) 為骨架最被廣為應用。而我們卻以雌性激素中之雌二醇 (estradiol) 作為類固醇的部分，一方面是因為參照實驗室學姊之分子結構，方便之後在作比較時有同一個基準，二方面是現今對於雌性激素結構之自組裝機制仍了解得不多，但最重要原因則是雌二醇於結構上和其他類固醇骨架不同之處在於含有苯環 (aromatic ring)，不僅增加了自組裝所需之疏水性作用力 (hydrophobic interaction)，更能提供額外的 π - π 堆積作用力 (π - π stacking interaction)，使分子更容易自組裝形成超分子結構。

連接鏈部分已於第二章引文中講述過，修飾上 Gly 或 U 這兩個親水性基團來增加分子水溶性和增強自組裝過程中的驅動力。文獻中類固醇衍生物，大部分是由類固醇 3 號位置進行衍生化而得，較少提及若由類固醇 7 號位置進行衍生化對於分子堆疊會有何影響，故連接方式選擇由較少見雌二醇 7 號位置連接出去。

芳香環部分即為螢光團的部分，環境敏感的螢光團則選擇已經廣泛運用在螢光感測分子或探針上之 **3-HF**。**3-HF** 其因結構中具有苯環且較具平面性，不僅可提供自組裝所需的非共價作用力，同時也可作為環境探測者，利用螢光光譜 ESICT/ESIPT 比例大小變化 (**3-HF** 螢光團之螢光性質介紹詳見 1.4 章節)，可即時告知分子所處環境極性。2004 年周必泰教授與本實驗室合作，發表了一系列於不同位置修飾上推電子基的 **3-HF** 衍生物，並探討分子偶極矩的改變對於放光性質的影響，如圖 2-2 所示。⁹¹ 由此圖可發現於 4' 號碳上接有推電子基的 **3-HF** 衍生物 (化合物 **I**)，其兩種放光機制 (ESICT&ESIPT) 受環境極性影響的相對比例變化大，比例螢光性質最為明顯，具有較高的靈敏度。因此選擇以 **3-HF** 之 4' 號碳位置具有推電子基之結構並以醚鍵作連接 (醚基與胺基皆為推電子基)。為了凸顯 **3-HF** 螢光團具有兩個放射峰之比例性 (ratiometric) 的優點，另外選擇一具有有單一螢光放射峰、波長較長、量子產率高，且亦為環境敏感之 **DBD** 螢光團作為對照組，藉由觀察螢光強度的變化來初步判斷分子的聚集與否，並和螢光團為 **3-HF** 分子作比較。

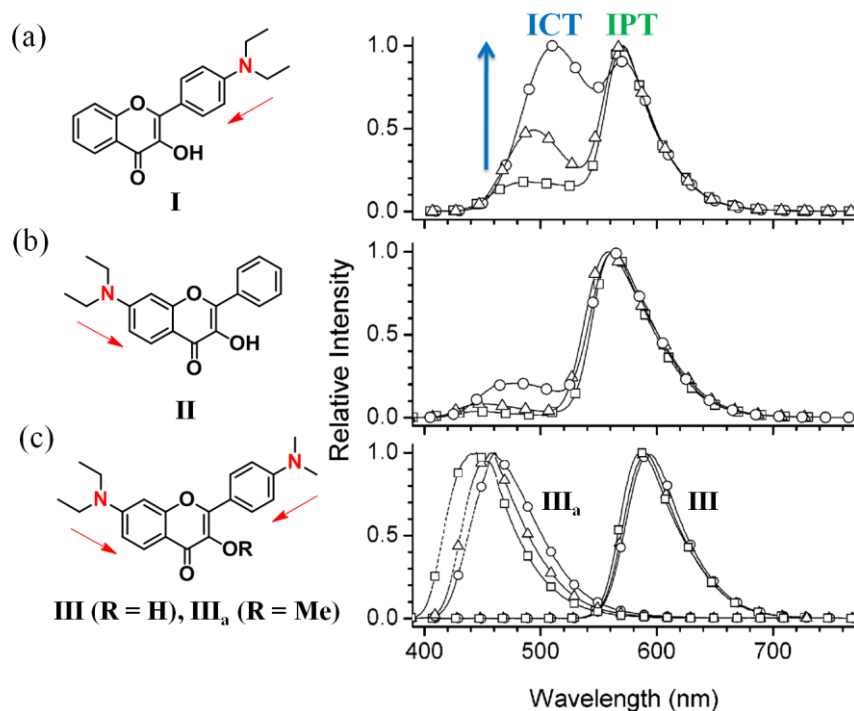


圖 2-2 化合物 **I**、**II**、**III**、**III_a** 之結構及在乙酸乙酯 (□)、二氯甲烷 (△)、乙腈 (○) 中之螢光光譜。⁹¹



2.2 共同前驅物化合物 8 之逆合成分析與合成步驟

由於 HF-7 α -Gly-EDIOL、HF-7 α -U-EDIOL、DBD-7 α -Gly-EDIOL 和 DBD-7 α -U-EDIOL 均含有相同前驅物化合物 8，故在這邊一起講述化合物 8 的逆合成分析與合成步驟。

如圖 2-3 所示，化合物 8 由化合物 6 先進行光延反應 (Mitsunobu reaction) 反應再進行施陶丁格反應 (Staudinger reaction) 而得。化合物 6 由化合物 5 進行氫硼化-氧化反應而得。化合物 5 則由化合物 3 進行還原反應，再將羥基以 THP 保護而得。化合物 3 由化合物 2 和 6-碘-1 己烯 (6-iodohexene) 進行 α 位向之烷基化而得，而其中 6-碘-1 己烯可由市售的 5-己烯-1-醇 (5-hexenol) 進行 Appel 反應而得。化合物 2 可由市售的雌二醇先以 THP 將羥基保護，接著在雌二醇 6 號位置衍生出羥基後，利用 PCC 試劑氧化成羰基而得。

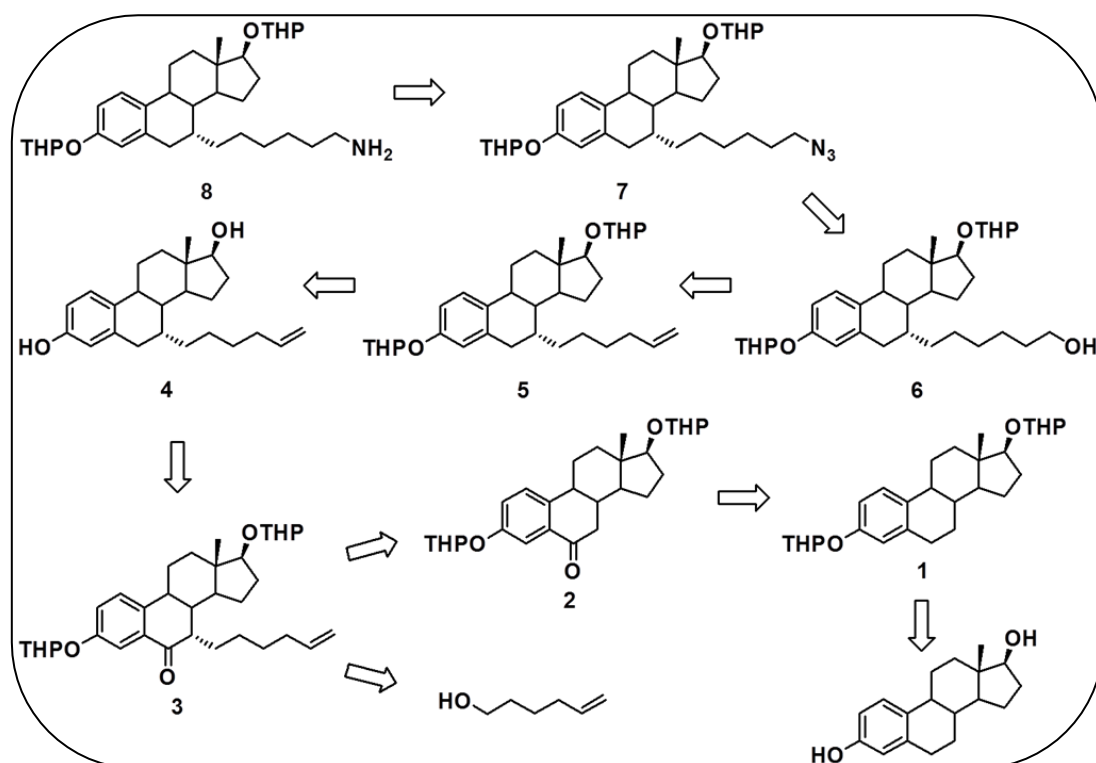
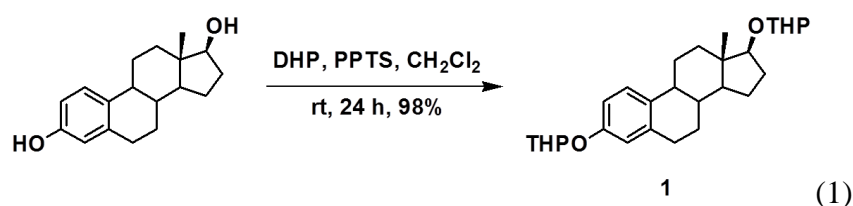
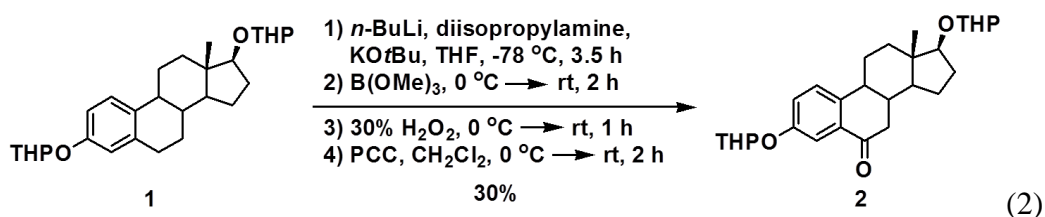


圖 2-3 化合物 8 之逆合成分析。

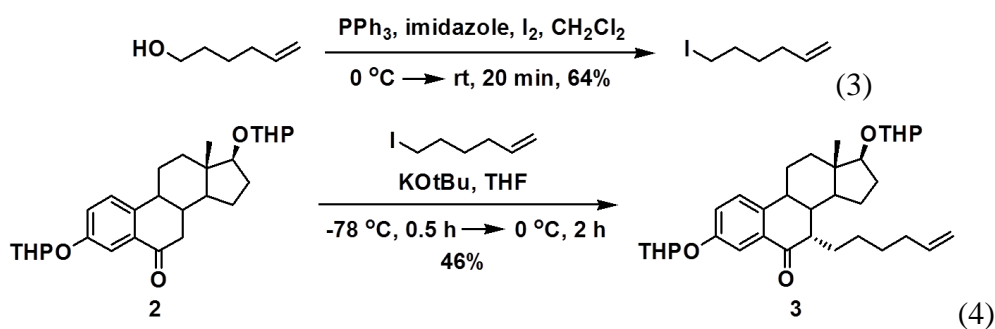
參考 Robert G. Croy 教授與其研究團隊之研究，⁹² 以雌二醇當作起始物開始合成化合物 **1**。首先將雌二醇 3 號位置 and 17 號位置羥基上保護，以免這兩個基團影響後面反應的進行。由於之後的反應條件有鹼，所以選用耐鹼性的保護基 tetrahydropyranyl (THP)。以二氯甲烷為溶劑，4-甲基苯磺酸吡啶 (pyridinium *p*-toluenesulfonate, PPTS) 當作酸催化試劑，與 3,4-dihydro-2H-pyran (DHP) 在室溫下反應 24 小時後，經加壓管柱層析純化，可得到化合物 **1**，產率 98%，如式 (1)。



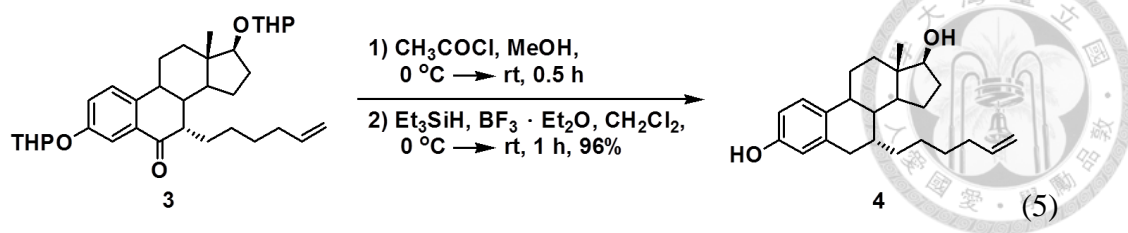
由於之後需要在化合物 **1** 之 7 號位置進行烷基化，故須先在 6 號位置建立羧基。以四氫呋喃為溶劑，第一步先於 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下利用正丁基鋰 (*n*-butyllithium) 將二異丙胺 (diisopropylamine) 去質子化產生 LDA 後，慢慢加入化合物 **1**。於 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反應 3.5 個小時，可移除 benzylic 位置的質子，第二步於 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下加入硼酸三乙酯 (trimethyl borate) 後回室溫反應兩個小時，形成 boronate 的中間產物，第三步於 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下加入 30% 過氧化氫水溶液進行氧化，回室溫反應 1 小時，即可在雌二醇 6 號位置建立羥基。第四步抽去溶劑後再溶於二氯甲烷，於 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下加入氯鉻酸吡啶酯 (pyridinium chlorochromate, PCC) 進行氧化，將 6 號位置羥基氧化為羧基，回室溫反應 2 小時，經加壓管柱層析純化後，可得到化合物 **2**，四步總產率為 30%，如式 (2)。



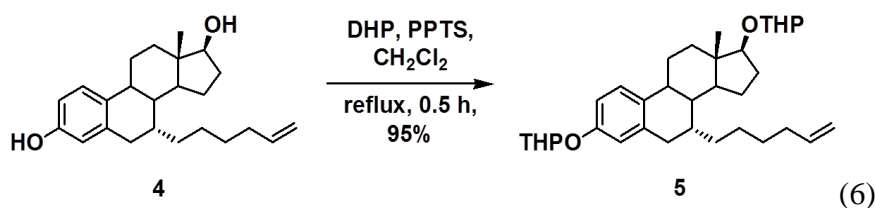
以四氫呋喃為溶劑，叔丁醇甲 (KO^tBu) 當作鹼，將化合物 **2** 之 7 號位置進行去質子化，之後於 -78 °C 下慢慢滴入已溶於四氫呋喃的 6-碘-1 己烯進行烷基化，滴完後移至冰浴下反應 2 小時，經加壓管柱層析純化後，可得到化合物 **3**，產率 46%，如式 (4)。而其中 6-碘-1 己烯是由市售的 5-己烯-1-醇進行 Appel 反應，將羥基轉換成離去能力較高的碘基，以利於烷基化的進行。5-己烯-1-醇和三苯基膦 (triphenylphosphine, PPh₃)、咪唑 (imidazole) 在二氯甲烷當溶劑條件，於 0 °C 下慢慢加入碘，再回室溫反應 20 分鐘，經加壓管柱層析純化後，可得到 6-碘-1 己烯，產率 64%，如式 (3)。本實驗室余柔靚學姊在其碩士論文中，已藉由 2D NMR ¹H-¹H NOESY 圖譜分析及 X-ray 結構鑑定分析，確認化合物 **3** 之 6 號位置烷基位向為 α 位向。⁸⁹



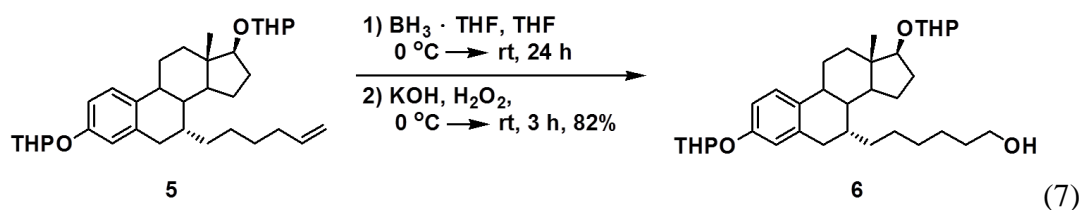
進行羰基還原時會部分去除 THP 保護，為避免去 THP 保護不完全，故在這之前，先利用乙醯氯將化合物 **3** 之 THP 保護去除。⁹³ 以甲醇為溶劑，0 °C 下加入乙醯氯，再回室溫反應 0.5 小時，經乙酸乙酯再結晶後，抽乾溶劑再溶於二氯甲烷，0 °C 下加入三乙基矽烷 (Et₃SiH) 及三氟化硼乙醚 (BF₃·Et₂O) 進行羰基還原反應，回室溫反應 1 小時，經加壓管柱層析純化後，可得到化合物 **4**，兩步產率 96%，如式 (5)。



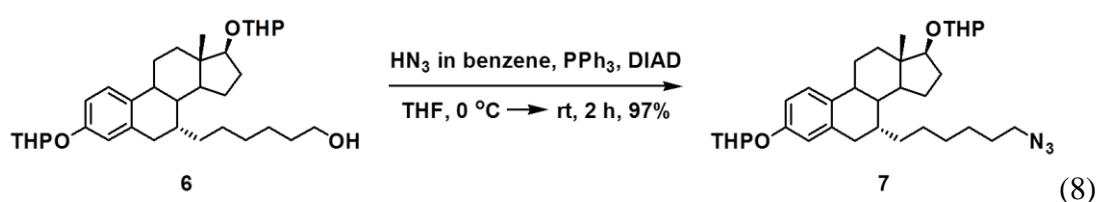
為避免 3 號和 17 號位置的活性基團-羥基影響後面反應，且後續反應條件之中也有鹼，故一樣選用 THP 當作保護基。以二氯甲烷為溶劑，4-甲基苯磺酸吡啶當作酸催化試劑，化合物 4 與 DHP 在迴流下反應 0.5 小時，經加壓管柱層析純化後，可得到化合物 5，產率 95%，如式 (6)。需注意此步驟不能迴流太長時間，否則產物會被分解。



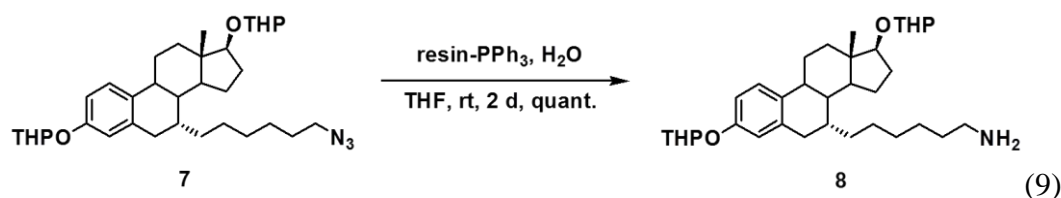
為引入親核性基團-胺基於化合物 5 之 7 號位置長碳鏈末端，需先引入羥基再進行官能基轉換。故化合物 5 以四氫呋喃為溶劑，在 0 °C 下加入硼烷 (borane) 試劑，回室溫反應 24 小時進行反馬可尼可夫 (anti-Markovnikov) 的氫硼化-氧化反應。生成三烷基硼 (trialkylborane) 中間物後，於 0 °C 下加入氫氧化鉀與過氧化氫水溶液，回室溫反應 3 小時，在鹼性條件將烷基硼氧化成羥基，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 6，兩步產率 82%，如式 (7)。



化合物 **6** 進行 Mitsunobu 反應可將羥基轉換為疊氮基。⁹⁴ 以四氫呋喃為溶劑，三苯基磷與偶氮二甲酸二異丙酯 (DIAD) 形成具高度親電性的中間體後，和具有親核性羥基之化合物 **6** 結合，藉由強的磷-氧鍵使羥基變成好的離去基，再與被中間體去質子的親核試劑-疊氮酸 (HN₃) (疊氮化鈉與硫酸反應 in situ 製備) 進行親核性取代反應，室溫下反應 2 小時，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 **7**，產率 97%，如式 (8)。



化合物 **7** 進行 Staudinger 反應可將疊氮基轉換為胺基。⁹⁵ 以四氫呋喃為溶劑，化合物 **7** 上疊氮基團與樹脂上的三苯基磷進行親核性加成反應，分子內環化再脫去一分子氮氣形成亞胺基磷烷中間體，之後將中間體水解為胺和副產物-三苯基氧化磷 (triphenylphosphine oxide)，室溫下反應 2 天，經過濾純化後，可得目標物化合物 **8**，產率 100%，如式 (9)。使用三苯基磷樹脂的原因為反應產生的副產物可直接經由過濾樹脂的方式除去，不需要再純化。



2.3 螢光團衍生物 4'-EA-3-HF 與 7-EDADBBD 之逆合成分析與合成步驟

由於 HF-7 α -Gly-EDIOL、HF-7 α -U-EDIOL 皆含有相同螢光團衍生物 4'-EA-3-HF，而 DBD-7 α -Gly-EDIOL、DBD-7 α -U-EDIOL 則有相同螢光團衍生物 7-EDADBBD，故一併描述這兩個螢光團衍生物的逆合成分析與合成步驟。

2.3.1 螢光團衍生物 4'-EA-3-HF

如圖 2-4 所示，4'-EA-3-HF 可由化合物 11 進行 Staudinger 反應而得。化合物 11 則由化合物 10 和市售的 2-羥基苯乙酮 (2-hydroxyacetophenone) 先進行克來森-施密特縮合反應 (Claisen-Schmidt Condensation) 再進行阿爾格-弗林-大山田反應 (Algar-Flynn-Oyamada reaction) 而得。化合物 10 由化合物 9 與疊氮化鈉 (sodium azide) 進行親核性取代反應而得。化合物 9 由市售的 4-羥基苯甲醛 (4-hydroxybenzaldehyde) 和 1,2-二溴乙烷 (ethylene dibromide) 進行單邊親核性取代反應而得。⁹⁶

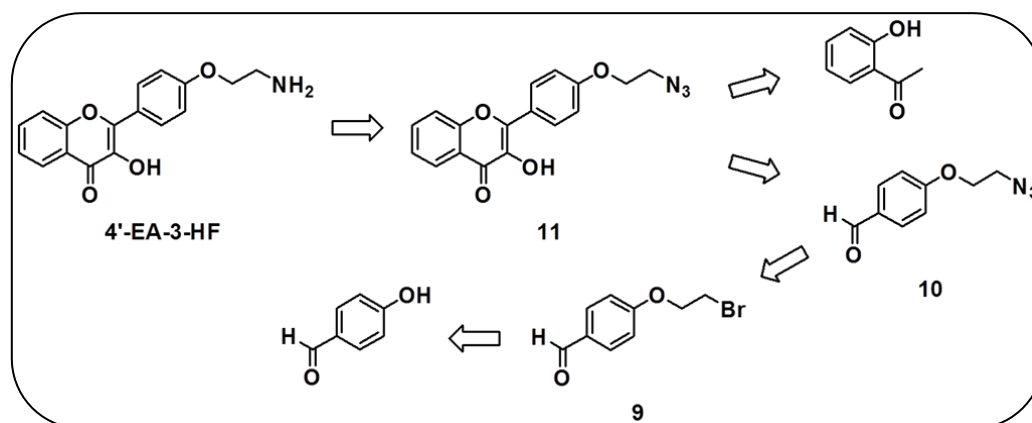
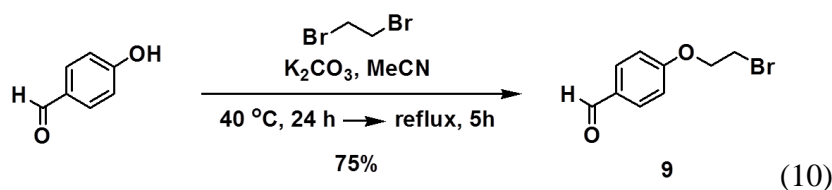
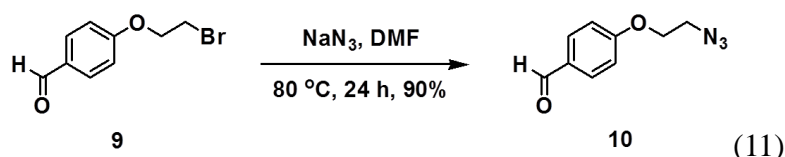


圖 2-4 螢光團衍生物 4'-EA-3-HF 之逆合成分析。

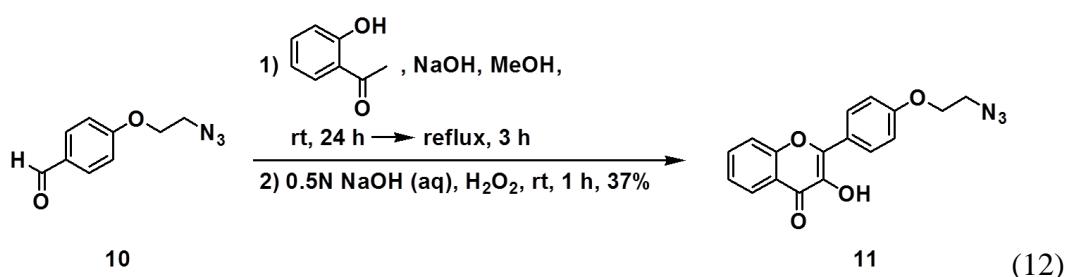
以乙腈為溶劑，碳酸鉀 (K_2CO_3) 當作鹼，藉由加入過當量 (5 當量) 1,2-二溴乙烷使反應只進行單邊 S_N2 反應，在 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 下反應 24 小時後發現反應尚未完全，故升溫使反應迴流 5 小時，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 9，產率 75%，如式 (10)。在迴流條件下反應 5 小時後，雖然反應完全，但發現有雙邊取代的副產物產生，故不能在迴流下反應過久。



將化合物 **9** 上的溴基轉換為疊氮基。⁹⁷ 以 *N,N*-二甲基甲醯胺 (DMF) 為溶劑，因溴基為好的離去基，故可與親核試劑疊氮化鈉進行親核性取代反應，在 80 °C 下反應 24 小時，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 **10**，產率 90%，如式 (11)。

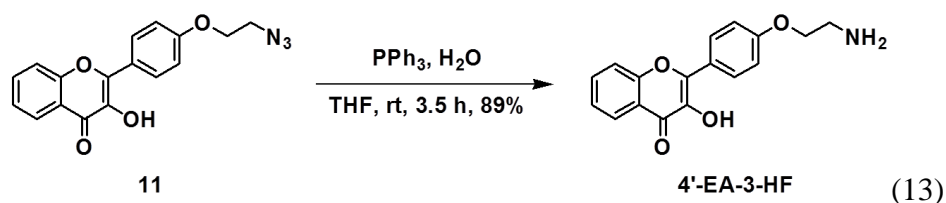


接下來進行兩步反應建構 **3-HF** 螢光團的核心結構。⁹⁷ 首先將化合物 **10** 與市售的 2-羥基苯乙酮進行 Claisen-Schmidt 縮合反應，以甲醇為溶劑，氫氧化鈉將酮基旁的 α 氫去質子形成烯醇 (enolate)，再與化合物 **10** 上的醛基進行親核加成，脫去一分子的水後形成 α,β -不飽和酮之中間產物，此步原先在室溫下反應 24 小時，發現反應未完全。於是升溫使反應迴流 3 小時，但發現有雜點生成，且有越來越濃的趨勢，就繼續進行下一步反應。第二步進行 Algar-Flynn-Oyamada 反應，先加入 0.5 N 氫氧化鈉水溶液進行合環後，再加入過氧化氫水溶液進行氧化，室溫下反應 1 小時，移除溶劑，經再結晶純化後，可得具螢光之化合物 **11**，兩步產率 37%，如式 (12)。由實驗室學長姐經驗得知，將這兩步分開做或合起來做產率都差不多，故選擇將兩步合在一起，節省純化的時間。



化合物 **11** 進行 Staudinger 反應可將疊氮基還原為胺基。⁹⁵ 以四氫呋喃為溶劑，室溫下反應 3.5 小時，經過濾純化後，可得目標物化合物 **4'-EA-3-HF**，產率 89%，

如式 (13)。沒有使用三苯基磷樹酯是因為產物和副產物對有機溶劑的溶解度差異很大，可利用此差異將產物與副產物或雜質分離，達到純化的目的，因此不需使用到較昂貴的三苯基磷樹酯來進行反應。



2.3.2 螢光團衍生物 7-EDADBD

如圖 2-5 所示，**7-EDADBD** 由化合物 **12** 與市售的乙二胺 (ethylenediamine) 進行單邊芳香性親核取代反應 (S_NAr) 而得。化合物 **12** 由市售的 4-氯苯并呋喃 (4-chlorobenzofurazan) 先進行芳香性磺化反應 (aromatic sulfonation reaction) 後再進行加成離去反應而得。

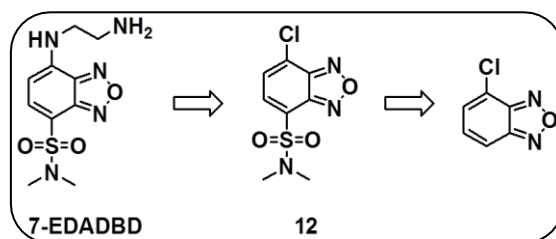
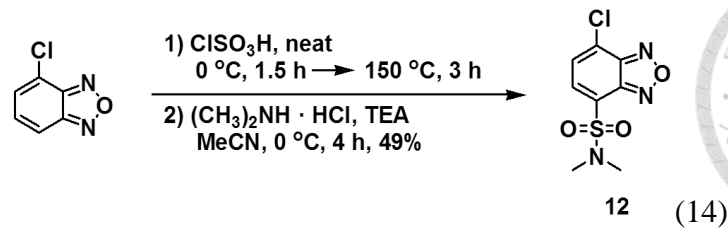
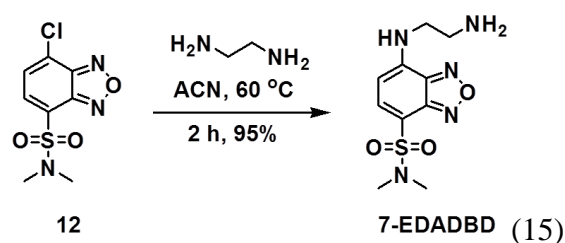


圖 2-5 螢光團衍生物 **7-EDADBD** 之逆合成分析。

以氯磺酸試劑當作溶劑，在 0 °C 下慢慢滴入 4-氯苯并呋喃並反應 1.5 小時後，升溫至 150 °C 反應 3 小時，經萃取和再沉澱後，可得 4 號位置為磺醯氯基的中間產物。加入乙腈為溶劑，和已先用三乙胺 (triethylamine, TEA) 中和的二甲胺鹽酸鹽於冰浴下反應 4 小時，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 **12**，兩步產率 49%，如式 (14)。^{98,99}



以乙腈為溶劑將化合物 **12** 溶解後，藉由加入過當量 (39 當量) 乙二胺使反應只進行單邊 S_NAr 反應，60 °C 下反應 2 小時，經加壓管柱層析純化後，可得目標產物 **7-EDADBD**，產率 95%，如式 (15)。¹⁰⁰



2.4 HF-7 α -Gly-EDIOL、DBD-7 α -Gly-EDIOL 之逆合成分析與合成步驟

由於 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 這兩個分子相似，差異只在於螢光團的部分，因此一起介紹兩者的逆合成分析與合成步驟。若要將雌二醇和螢光團的部分利用親核取代反應連接起來，其中必須一個含有親核基團，另一個含有親電基團，目前化合物 **8** 與螢光團衍生物上均為親電基團，而比起化合物 **8**，螢光團衍生物在合成上較為容易，故選擇先將螢光團衍生物上的親核基團轉為親電基團，再將化合物 **8** 與螢光團衍生物連接在一起，同時於 linker 上引入 Gly 這個官能基。

2.4.1 HF-7 α -Gly-EDIOL

如圖 2-6 所示，**HF-7 α -Gly-EDIOL** 由化合物 **14** 去 THP 保護而得。共同前驅物化合物 **8** 與化合物 **13** 進行 S_N2 取代反應後，可得連接雌二醇與螢光團之化合物 **14**。化合物 **13** 由螢光團衍生物 **4'-EA-3-HF** 與活化過的碘乙酸進行加成離去反應

而得。

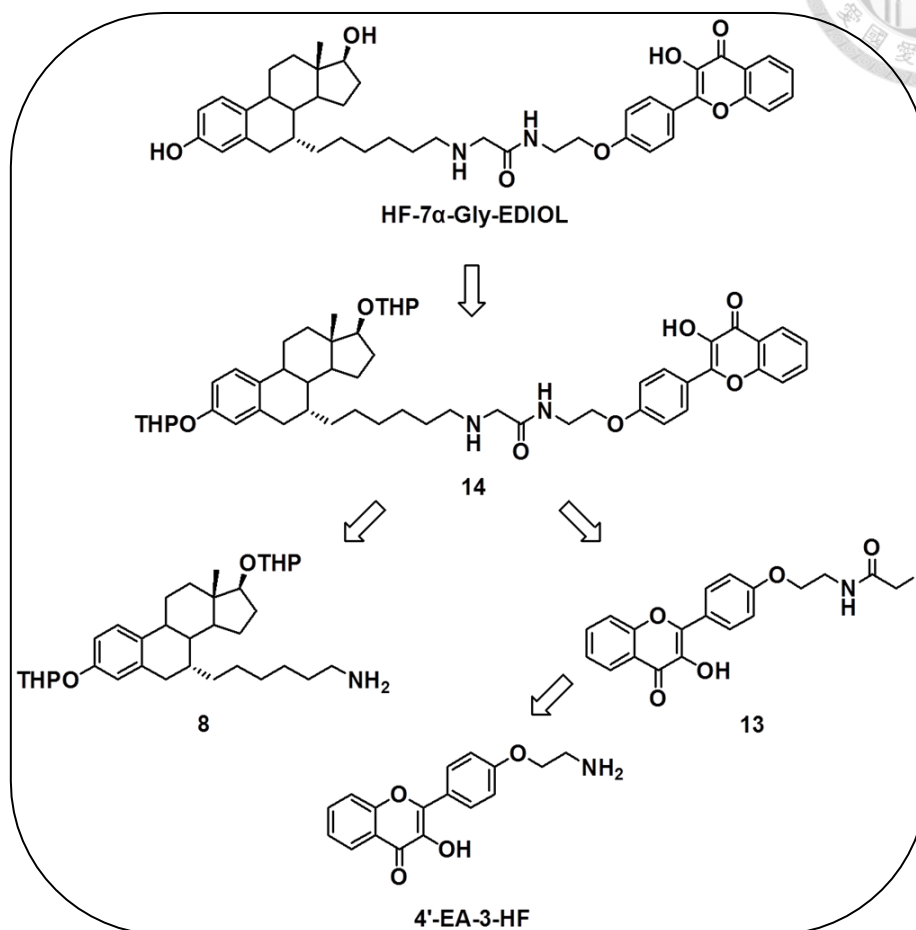
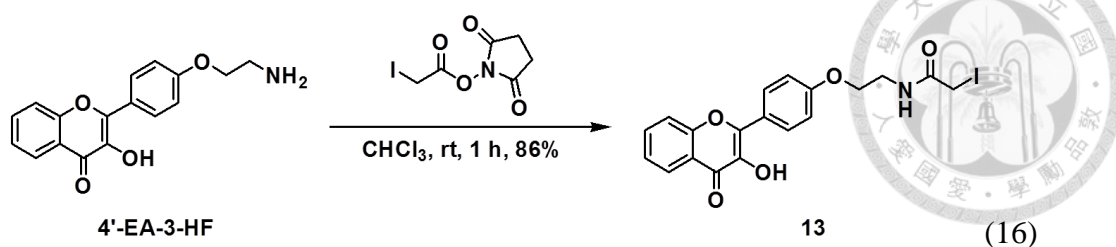
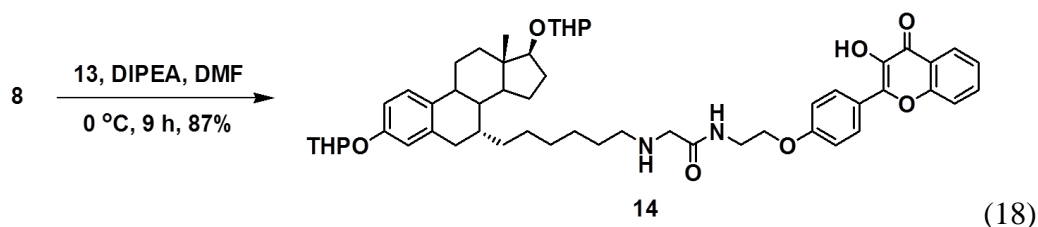
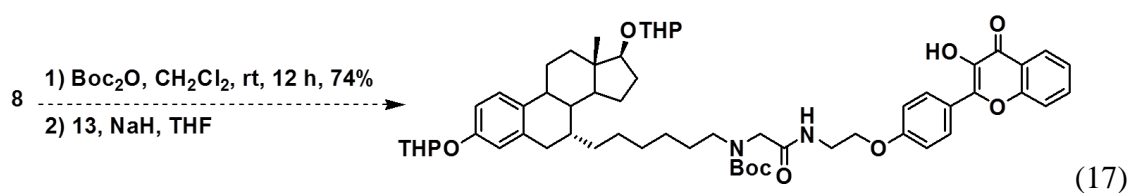


圖 2-6 螢光團衍生物 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 之逆合成分析。

螢光團衍生物 **4'-EA-3-HF** 與經 *N*-羥基琥珀醯亞胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS) 活化過的碘乙酸進行加成離去反應。⁹⁵ 在此反應中會有 S_N2 反應做競爭，但 S_N2 反應速率會受到溶劑、立障等因素影響，故縱使碘是一個好的離去基，加成離去的反應速率較 S_N2 反應快。以氯仿為溶劑，於室溫下將 **4'-EA-3-HF** 慢慢滴入經活化的碘乙酸中，反應 1 小時，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 **13**，產率 86%，如式 (16)。

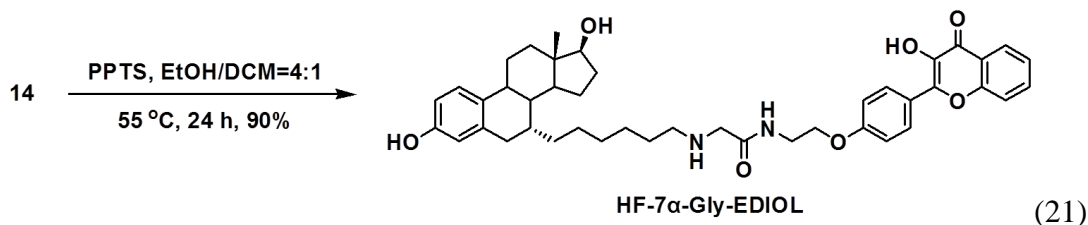
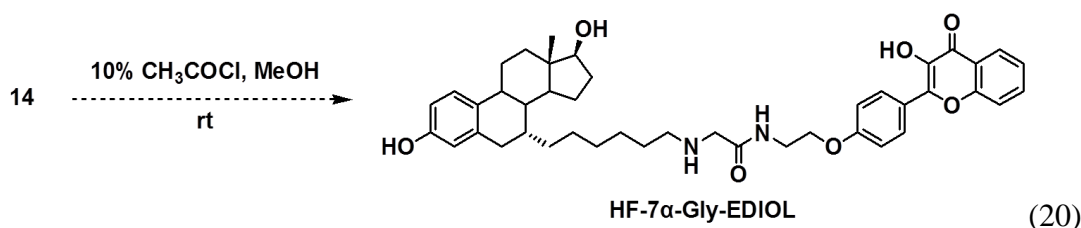
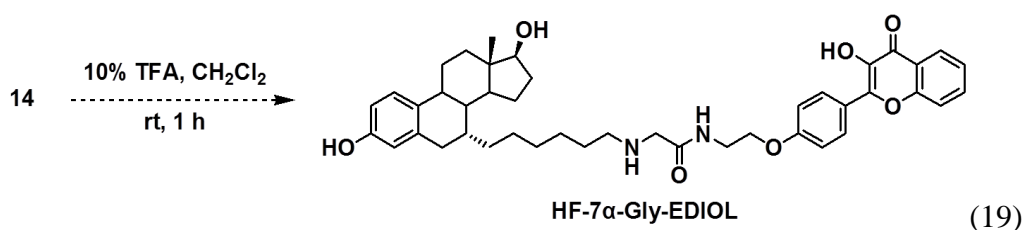


接下來要將雌二醇和螢光團部分利用 S_N2 取代反應連接起來。由於碘的活性太高，發現有一個雌二醇連接兩個螢光團的副產物產生，而此副產物和產物的極性相似，管柱層析分離不易，故嘗試把化合物 **8** 上的胺基利用叔丁氧羰基 (*tert*-butyloxycarbonyl, Boc) 保護起來，再利用氫化鈉將二級胺去質子後與化合物 **13** 進行 S_N2 反應，如式 (17)，但並沒有得到預期的產物。最後還是採當量數控制和慢慢滴加的方式，成功得到只有一個螢光團之產物。以 DMF 當作溶劑，*N,N*-二異丙基乙基胺 (DIPEA) 當作鹼，將化合物 **13** 於 0°C 下分 9 小時慢慢滴入含有化合物 **8** 的溶液中，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 **14**，產率 87%，如式 (18)。值得一提，化合物 **13** 剛開始可以較快的速度滴加，然而越到後期滴入速度就要越慢，不然很容易就會有兩個螢光團的副產物出現。



最後則是將化合物 **14** 的 THP 保護基移除，得到雌二醇 3 號和 17 號位置為羥基之產物。一開始是參照實驗室余柔靚學姊去 THP 保護的方法，⁸⁹ 在 10% 的三氟乙酸/二氯甲烷條件下，室溫反應 1 小時，純化後並未得到預期產物，如式 (19)。

之後使用化合物 **3** 去 THP 保護的條件，在 10% 的乙醯氯/甲醇條件室溫反應，純化後也並未得到預期產物，如式 (20)。推測這兩個反應條件對於化合物 **14** 太過劇烈，因此更換為較溫和的反應條件。以乙醇和二氯甲烷為共溶劑，PPTS 當作催化劑，酸性條件下進行水解，55 °C 下反應 24 小時，經加壓管柱層析純化後，可得目標產物 **HF-7 α -Gly-EDIOL**，產率 90%，如式 (21)。



2.4.2 DBD-7 α -Gly-EDIOL

如圖 2-7 所示，**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 由化合物 **16** 去 THP 保護而得。共同前驅物化合物 **8** 與化合物 **15** 進行 S_N2 取代反應後，可得連接雌二醇與螢光團之化合物 **16**。化合物 **13** 由螢光團衍生物 **7-EDADBD** 與活化過的溴乙酸進行加成離去反應而得。利用活化過的溴乙酸而非碘乙酸的原因，是希望若將離去基改成反應性較低的溴，能避免進行兩次雌二醇與螢光團的 S_N2 反應。但實驗結果顯示溴的活性還是過高，依然須採用當量數控制和慢慢滴加的方式控制產物的生成。

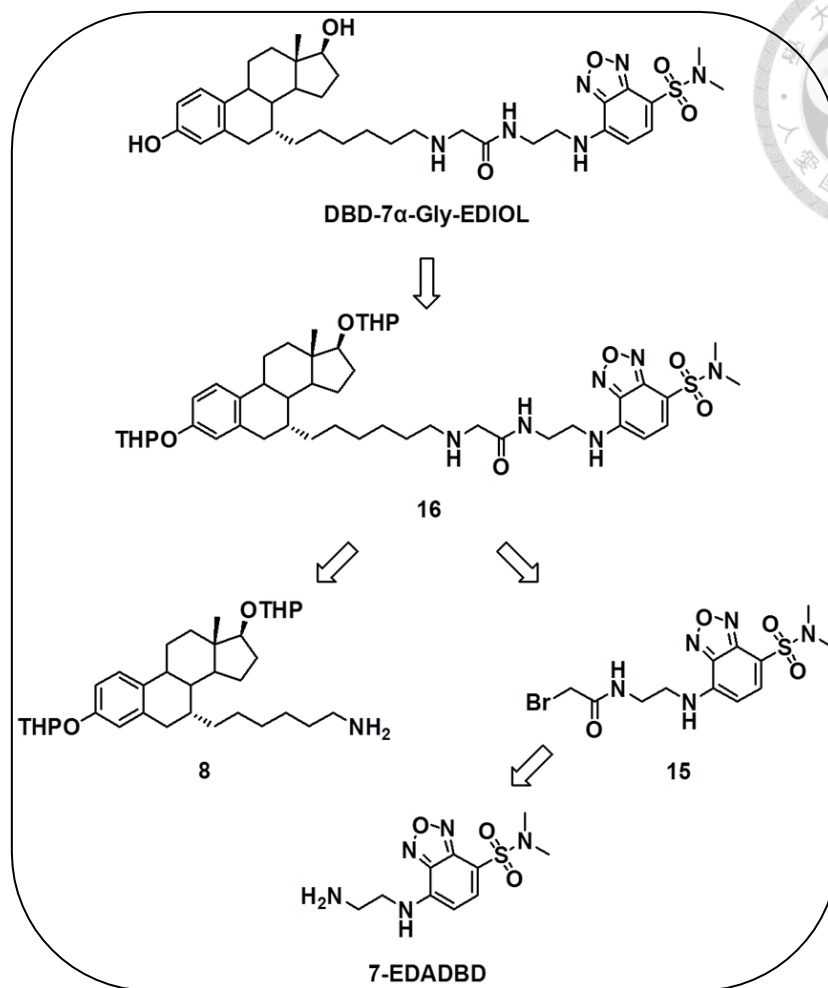
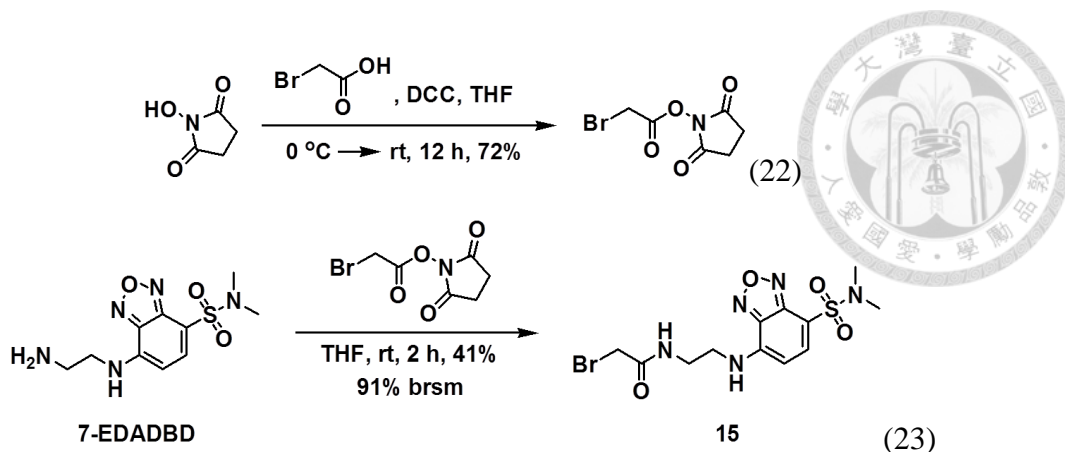
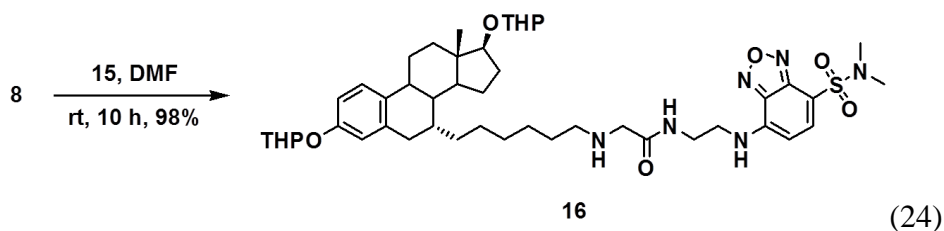


圖 2-7 螢光團衍生物 DBD-7 α -Gly-EDIOL 之逆合成分析。

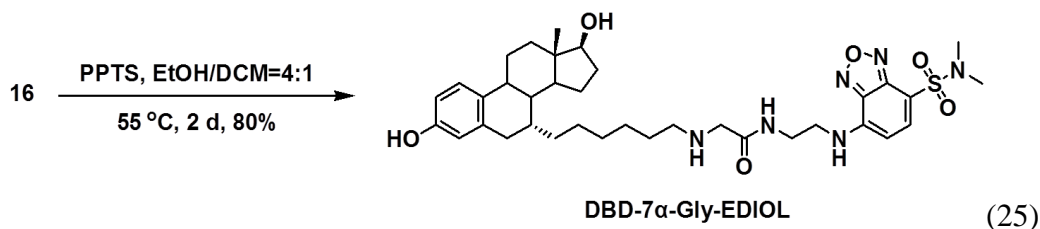
在合成化合物 **15** 之前，須先活化溴乙酸。¹⁰¹ 以四氫呋喃為溶劑，0 °C 下加入脫水試劑 *N,N'*-二環己基碳二亞胺 (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)，先與溴乙酸形成高活性的中間體，再和 NHS 的羥基進行加成離去反應，回室溫反應 12 小時，經再沉澱純化後，可得活化產物，產率 72%，如式 (22)。接著螢光團衍生物 **7-EDADBD** 與經活化過的溴乙酸進行加成離去反應。以四氫呋喃為溶劑，於室溫下將 **7-EDADBD** 慢慢滴入，反應 2 小時，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 **15**，產率 41%，回收起始物後產率為 91%，如式 (23)。



接下來利用 S_N2 取代反應將雌二醇和螢光團部分連接起來，反應條件和加料方式同式 (18)。將化合物 **15** 於室溫下分 10 小時慢慢滴入化合物 **8** 中，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 **16**，產率 98%，如式 (24)。



化合物 **16** 去 THP 保護條件同式 (21)，在酸性條件下進行水解， $55\text{ }^\circ\text{C}$ 下反應 2 天，經加壓管柱層析純化後，可得目標產物 **DBD-7 α -Gly-EDIOL**，產率 80%，如式 (25)。



2.5 HF-7 α -U-EDIOL、DBD-7 α -U-EDIOL 之逆合成分析與合成步驟

由於 **HF-7 α -U-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 這兩個分子相似，差異只在於螢

光團的部分，因此一起介紹兩者的逆合成分析與合成步驟。在連接雌二醇與螢光團部分時，原本也想利用合成 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 的方法進行反應。從螢光團部分出發，將螢光團衍生物上的親核基團轉換為親電基團，但過程並不是那麼順利，後面合成步驟上再作詳述，故選擇從雌二醇的部分出發。將化合物 **8** 上的親核基團轉為親電基團，最後才將化合物 **8** 與螢光團衍生物連接在一起，同時於 linker 上引入尿素 (urea, U) 這個官能基。

2.5.1 DBD-7 α -U-EDIOL

如圖 2-8 所示，**DBD-7 α -U-EDIOL** 由化合物 **18** 去 THP 保護而得。化合物 **18** 由化合物 **17** 與螢光團衍生物 **7-EDADBD** 進行加成離去反應而得。化合物 **17** 由共同前驅物化合物 **8** 與二(對硝基苯)碳酸酯 (Bis(4-nitrophenyl) carbonate) 進行單邊加成離去反應而得。

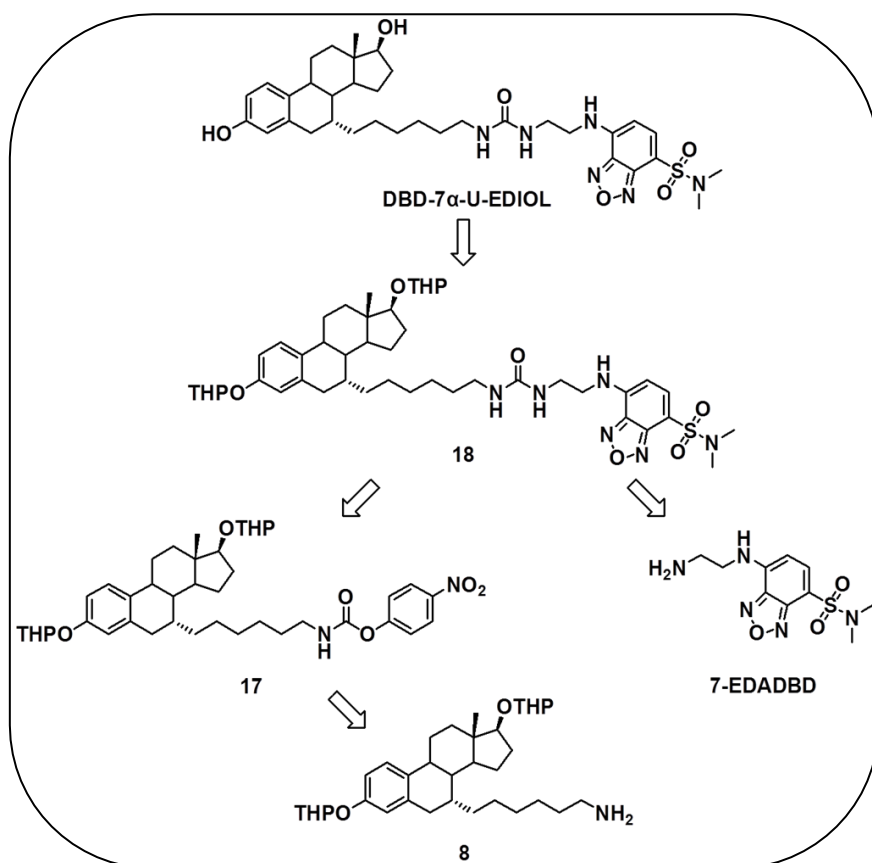
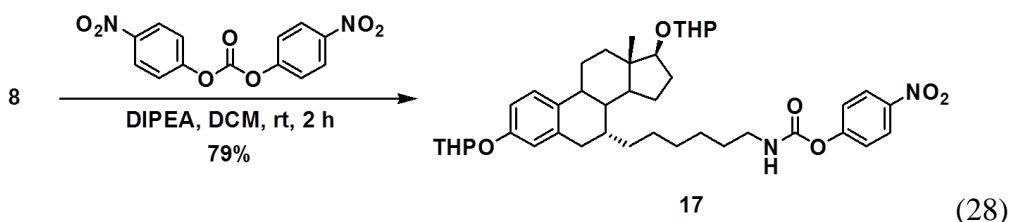
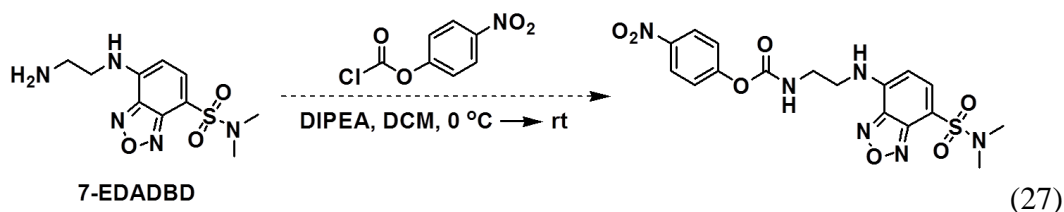
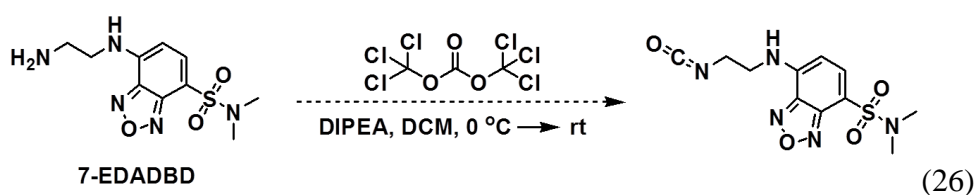
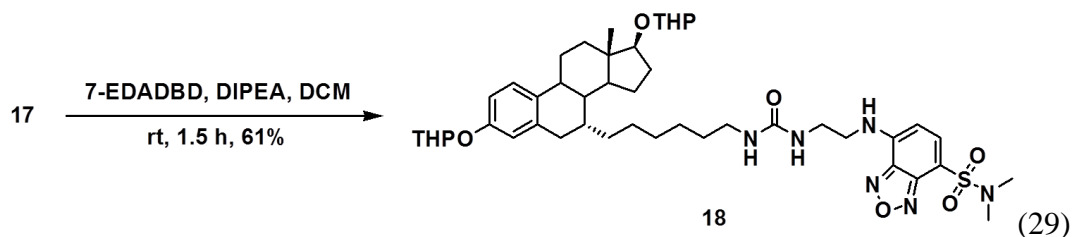


圖 2-8 螢光團衍生物 **DBD-7 α -U-EDIOL** 之逆合成分析。

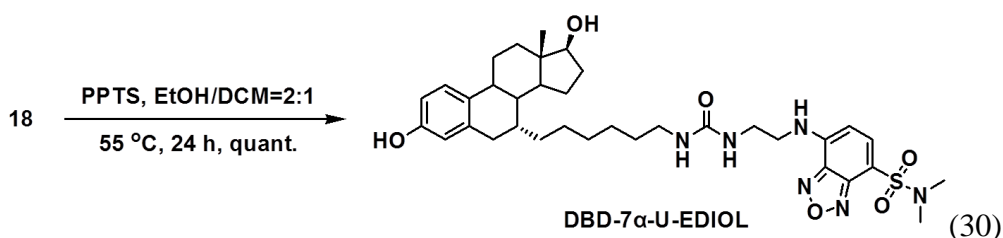
在 2.5 章節一開始有提到，將螢光團衍生物上的親核基團轉換為親電基團的過程發生了一些問題。參考了許多文獻，建立 U 官能基團最直接的方法就是，利用胺基和光氣 (phosgene) 反應會產生含異氰酸酯 (isocyanate) 官能基的中間體，再和另一個帶有胺基的分子反應，就可得含有尿素官能基的分子。因此以二氯甲烷為溶劑，DIPEA 當作鹼，由於光氣為毒性氣體，故選擇較安定的三光氣替代，在 0 °C 下加入，回室溫反應後，並沒有得到預期的 isocyanate 中間體，如式 (26)。懷疑是因為三光氣活性太高，進行了許多副反應，且 isocyanate 中間體也容易和其他親核基團反應，很難進行純化，因此決定以活性相對較弱的對硝基苯基氯甲酸酯來取代三光氣，¹⁰² 但一樣沒有得到預期的產物，如式 (27)。後來發現，螢光團衍生物 **7-EDADBD** 與帶有兩個離去基的高活性試劑進行第一次加成離去反應後，很快的會進行第二次分子內加成離去反應，進而合環得到螢光團 7 號位置為一 5 圓環的產物，意外發現了三光氣應答型螢光探針，這部分會在本論文的第二部分作討論。最後嘗試以化合物 **8** 為起始物，一樣以二氯甲烷為溶劑，DIPEA 當作鹼，將化合物 **8** 慢慢滴入二(對硝基苯)碳酸酯中，如此一來便可只進行單邊加成離去反應，室溫下反應 2 小時，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 **17**，產率 79%，如式 (28)。



化合物 **17** 上還有一個離去基，可與螢光團衍生物 **7-EDADBD** 再進行一次加成離去反應，便可將尿素官能基引入 linker 中，順便將雌二醇與螢光團部分連接在一起。以二氯甲烷為溶劑，DIPEA 當作鹼，室溫下反應 1.5 小時，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 **18**，產率 61%，如式 (29)。



化合物 **18** 去 THP 保護條件同式 (21)，在酸性條件下進行水解，55 °C 下反應 24 小時，經加壓管柱層析純化後，可得目標產物 **DBD-7 α -U-EDIOL**，產率 100%，如式 (30)。



2.5.2 HF-7 α -U-EDIOL

如圖 2-9 所式，**HF-7 α -U-EDIOL** 由化合物 **19** 去 THP 保護而得。化合物 **18** 由化合物 **17** 與螢光團衍生物 **4'-EA-3-HF** 進行加成離去反應而得。化合物 **17** 合成方法同式 (28)。

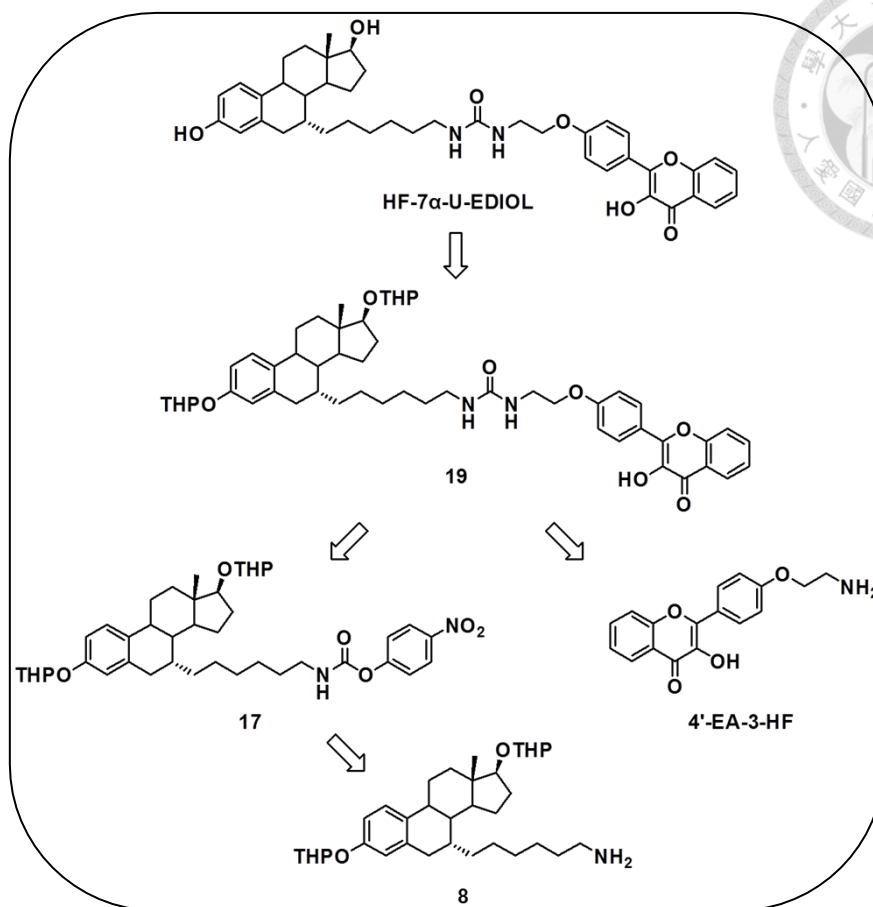
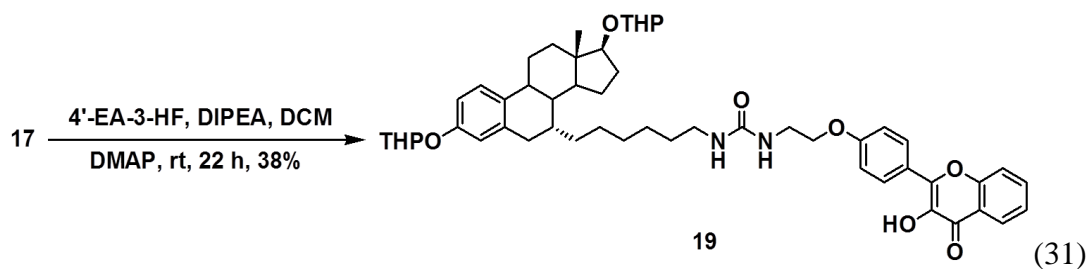
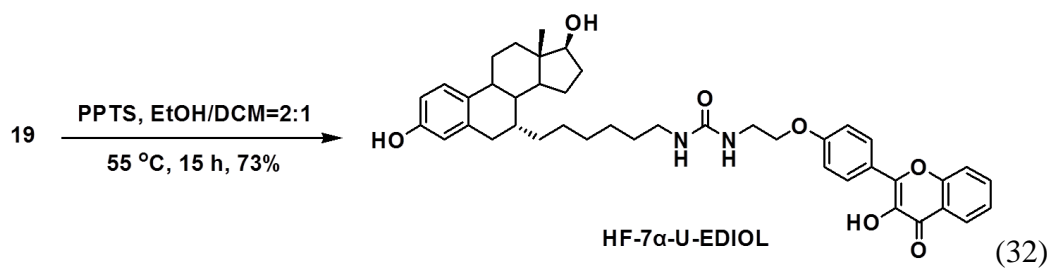


圖 2-9 螢光團衍生物 HF-7 α -U-EDIOL 之逆合成分析。

將化合物 **17** 與螢光團衍生物 **4'-EA-3-HF** 進行加成離去反應的合成條件同式 (29)，室溫下反應 4 小時後，由 TLC 發現起始物還很多，可能 **4'-EA-3-HF** 的親核性沒有 **7-EDADBD** 來的好，故又再加入 4-二甲氨基吡啶 (4-dimethylaminopyridine, DMAP) 當作催化劑，室溫下反應 18 小時，經加壓管柱層析純化後，可得化合物 **19**，產率 38%，如式 (31)。



化合物 **19** 去 THP 保護條件同式 (21)，在酸性條件下進行水解，55 °C 下反應 15 小時，經加壓管柱層析純化後，可得目標產物 **HF-7 α -U-EDIOL**，產率 73%，如式 (32)。



第三章 雌二醇螢光分子之物理性質探討



3.1 螢光性質探討

如同 1.4 和 1.5 章節所述，**3-HF** 和 **DBD** 均為對環境敏感的螢光團，藉由觀察 **3-HF** 的 ESICT/ESIPT 螢光強度比例變化，或者是 **DBD** 單純螢光強度的改變，可以即時得知分子是處於較親水或者是較疏水的環境，進而推測分子自組裝行為是否發生。因此將合成之 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL**、**DBD-7 α -U-EDIOL** 分子分別溶於不同的 DMSO 與 H₂O 之混合溶劑中，濃度為 10 μ M，進行螢光性質的測定和探討，最後再與余柔靚學姊分子 **HF-EDINH₂**、**HF-EDISO₄H**、**HF-7 α -EDIOL**、**HF-7 α -EDISO₄H** 和蘇怡文學姊分子 **HF-3-EDIGuid**、**HF-3-EDICO₂H** 與 **HF-7-EDISO₄H** 作綜合比較。^{89,90}

3.1.1 HF-7 α -Gly-EDIOL 與 HF-7 α -U-EDIOL 螢光性質探討

在 linker 上修飾 Gly 和 U 這兩個親水性基團，除了希望藉由官能基上的質子供體與質子受體來增加和水之間的氫鍵作用力，提升分子在水中之溶解度，也希望藉由增加分子和分子之間的氫鍵作用力，增強組裝過程中的驅動力，使分子可以堆疊得更有次序或更加緊密。將 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 或 **HF-7 α -U-EDIOL** 分子配製成濃度為 10 μ M，且溶劑為不同的 DMSO 與 H₂O 比例之混合，觀察 Gly 和 U 這兩個基團的引入是否會對螢光性質造成影響，並探討這兩個官能基團在螢光性質上的差異性。

HF-7 α -Gly-EDIOL

由圖 3-1 (a) 螢光光譜得知，**HF-7 α -Gly-EDIOL** 分子於 100% DMSO 中，由於溶劑屬於極性非質子性溶劑 (polar aprotic solvent)，因此螢光以 ESIPT 放射為主；理論上隨著水的比例增加，因質子溶劑的存在，水會競爭 **3-HF** 的分子內氫鍵導致 ESIPT 放射峰隨之下降，而 ESICT 放射峰則隨之上升。但在 80% DMSO 水溶液中，

雖然 ESICT 放射峰有上升，但 ESIPT 放射峰卻不降反升。推測造成此現象的原因為，在 100% DMSO 溶劑中，螢光團 3 號位置上羥基的質子會和 DMSO 作用，產生 $3\text{-HF}^-\cdots\text{DMSOH}^+$ 的錯合物，如圖 3-1 (e) 所示，¹⁰³ 使得進行 ESIPT 路徑的比例稍微下降。然而一旦有水的存在，此作用力就會被破壞，使得 ESIPT 放射峰上升，雖然水也會抑制 ESIPT 路徑，但在水占比例不高的情況下，破壞螢光團 3 號位置上羥基的質子和 DMSO 的作用大於抑制 ESIPT 路徑的作用，故才會在 80% DMSO 水溶液中發現 ESIPT 放射峰上升的現象。根據文獻所述， $3\text{-HF}^-\cdots\text{DMSOH}^+$ 最大吸收峰波長較 **3-HF** 長。¹⁰³ 由吸收光譜圖 3-1 (b) 中可以發現，在 100% DMSO 溶劑中，除 356 nm 有一個吸收峰外，於 448 nm 也有一個吸收峰，此即為 $3\text{-HF}^-\cdots\text{DMSOH}^+$ 錯合物的吸收峰，而一旦有水的存在，除 40% DMSO 水溶液外，均看不到錯合物的吸收峰，間接證明了錯合物的存在。回到圖 3-1 (a)，於 80% 至 5% DMSO 水溶液中，ESIPT 放射峰隨水的比例增加而下降，但 ESICT 卻有反轉的現象。當水的比例大於 50%，本應持續上升的 ESICT 放射峰卻開始下降，推測 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 分子開始形成螢光團在內的自組裝結構，因此螢光團周圍環境變得較為疏水，並於 5% DMSO 水溶液中堆疊得更加完全，導致幾乎沒有 ESICT 的螢光放射；由不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之 ESICT/ESIPT 比例圖可清楚看出轉折點為 40% DMSO 水溶液，如圖 3-1 (d)，推測此時 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 分子開始聚集且慢慢疏水，而螢光團周圍雖然沒有水但還是有 DMSO，所以在吸收光譜上可以看到 $3\text{-HF}^-\cdots\text{DMSOH}^+$ 錯合物的吸收峰；於 20% 和 5% DMSO 水溶液中，分子自組裝更加完全，且螢光團朝內，無法和 DMSO 作用產生 $3\text{-HF}^-\cdots\text{DMSOH}^+$ 錯合物，故此吸收峰又再度消失。由於不管是在什麼溶劑比例下，均由 ESIPT 放射峰主導，故相對應之螢光顯像圖均以綠色為主；但隨著水的比例增加，ESICT 放射峰逐漸上升，同時 ESIPT 峰逐漸下降，顏色越來越偏藍，於轉折點 40% DMSO 水溶液最為藍綠色；在 20% 和 5% DMSO 水溶液，幾乎沒有 ESICT 的螢光放射，所以綠色較深，又 ESIPT 螢光強度比起其他都還來的低，故顏色較暗，如圖 3-1 (c) 所示。

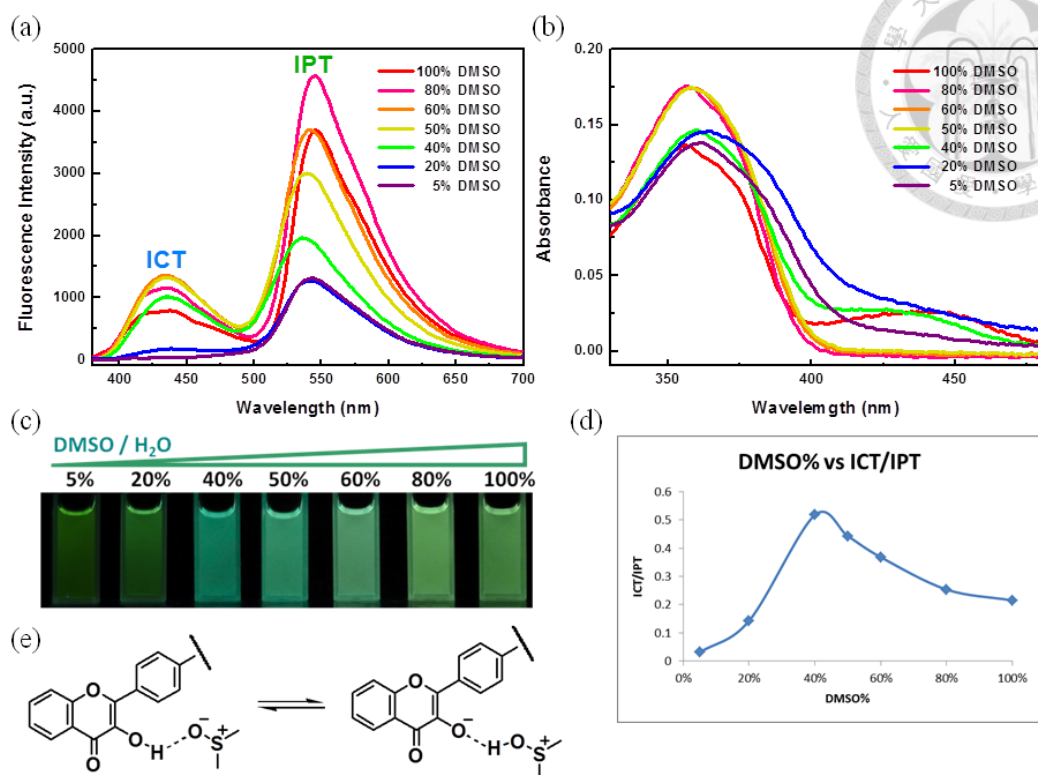


圖 3-1 **HF-7 α -Gly-EDIOL** (10 μ M) 分子在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之 (a) 螢光光譜， $\lambda_{\text{ex}} = 356$ nm， $\text{slit}_{\text{ex}} \& \text{slit}_{\text{em}} = 5$ nm；(b) 吸收光譜；(c) 相對應之螢光顯像圖，由左至右 DMSO 濃度分別為 5%，20%，40%，50%，60%，80%，100%；(d) ESICT/ESIPT 比例圖。(e) 3-HF⁻...DMSOH⁺ 錯合物生成示意圖。

HF-7 α -U-EDIOL

由圖 3-2 (a) 螢光光譜得知，**HF-7 α -U-EDIOL** 分子在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之螢光趨勢是差不多的，於 100% DMSO 中，由於溶劑屬於極性非質子性溶劑，因此螢光以 ESIPT 放射為主，且和 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 分子一樣，螢光團 3 號位置上羥基的質子會和 DMSO 作用，產生 3-HF...DMSOH⁺ 的錯合物，如圖 3-1 (e) 所示，故在吸收光譜較長波長處也可以看到一個吸收峰，如圖 3-2 (b) 紅線；當降低 DMSO 比例至 80% DMSO 水溶液時，在水占比例不高的情況下，破壞螢光團 3 號位置上羥基的質子和 DMSO 的作用大於抑制 ESIPT 路徑的作用，故 ESICT

和 ES IPT 放射峰均上升；於 80% 至 5% DMSO 水溶液中，隨水的比例增加，ES ICT 放射峰先升後降，ES IPT 放射峰先降後升，由不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之 ES ICT/ES IPT 比例圖可清楚看出轉折點為 40% DMSO 水溶液，如圖 3-2 (d)，推測 **HF-7 α -U-EDIOL** 分子開始形成螢光團在內的自組裝結構，因此螢光團周圍環境變得較為疏水，並於 5% DMSO 水溶液中堆疊得更加完全，致使幾乎沒有 ES ICT 的螢光放射。在螢光顯像圖中，於 100% 至 40% DMSO 水溶液均以藍綠色為主；但隨著水的比例增加，ES ICT 放射峰逐漸上升，同時 ES IPT 峰逐漸下降，顏色越來越偏藍，於轉折點 40% DMSO 水溶液，因 ES ICT 和 ES IPT 螢光強度幾乎相同，故顏色從綠偏藍轉變為藍偏綠；在 20% 和 5% DMSO 水溶液，幾乎沒有 ES ICT 的螢光放射，所以為深綠色而非藍綠色，如圖 3-2 (c) 所示。

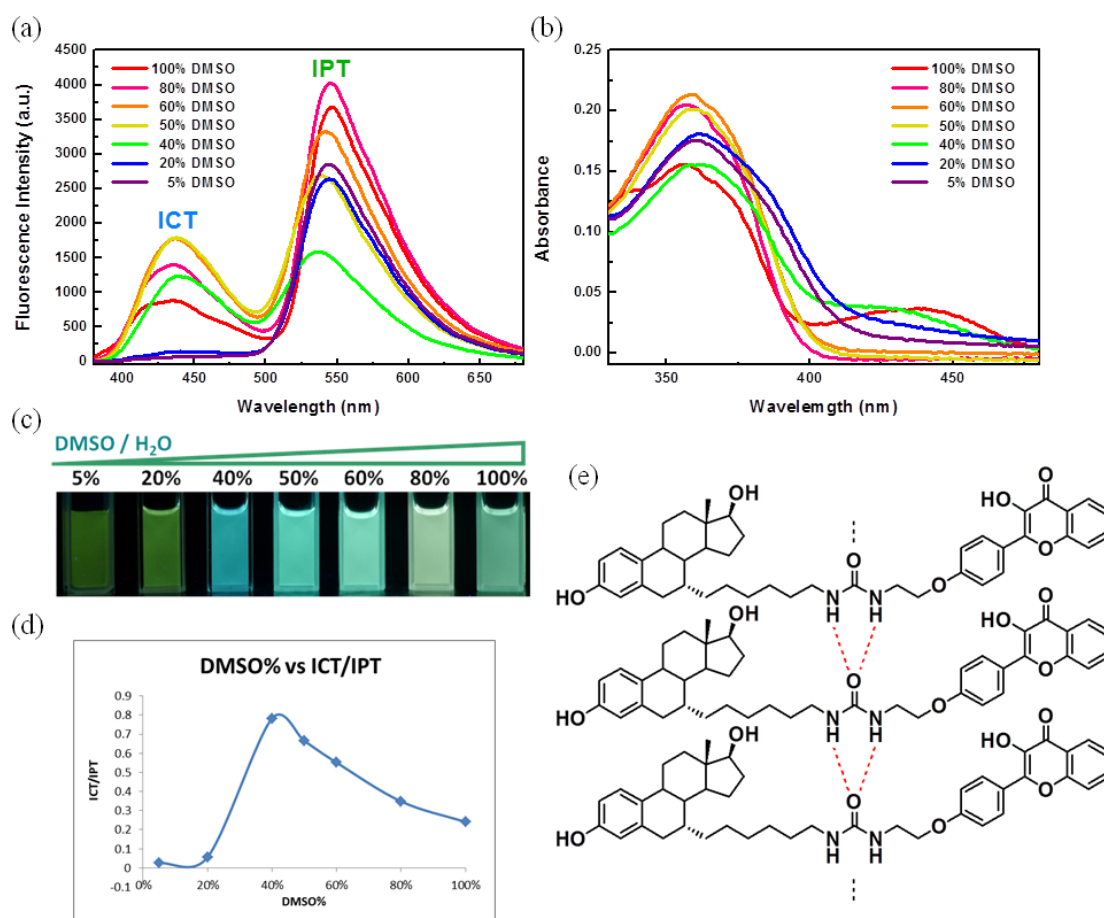


圖 3-2 **HF-7 α -U-EDIOL** (10 μ M) 分子在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之 (a) 螢光光譜， $\lambda_{\text{ex}} = 356 \text{ nm}$ ， $\text{slit}_{\text{ex}} \ \& \ \text{slit}_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ ；(b) 吸收光譜；(c) 相對應之螢光顯像圖，



由左至右 DMSO 濃度分別為 5%，20%，40%，50%，60%，80%，100%；(d) ESICT/ESIPT 比例圖。(e) **HF-7 α -U-EDIOL** 分子之間氫鍵作用力示意圖。

和 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 分子不同之處在於，**HF-7 α -U-EDIOL** 分子於 80% 至 5% DMSO 水溶液中 ESIPT 有反轉的現象，推測該分子 linker 上之尿素官能基能提供分子和分子之間氫鍵作用力，如圖 3-2 (e) 所示，使分子能堆疊得更加緊密，讓螢光團處於更疏水的環境，反觀 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 分子之甘胺酸官能基沒有此作用力，故於 20% 和 5% DMSO 水溶液，**HF-7 α -U-EDIOL** 分子的 ESIPT 放射峰螢光強度會比 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 分子來的高。

3.1.2 DBD-7 α -Gly-EDIOL 與 DBD-7 α -U-EDIOL 螢光性質探討

為了凸顯 **3-HF** 螢光團具有兩個放射峰之比例性 (ratiometric) 的優點，在此使用具有單一螢光放射峰且對環境敏感之 **DBD** 螢光團來取代 **3-HF** 螢光團，合成分子 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 與 **HF-7 α -U-EDIOL** 之對照組 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 與 **DBD-7 α -U-EDIOL**。將 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 或 **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子配製成濃度為 10 μ M，在不同的 DMSO 與 H₂O 比例之混合溶劑進行螢光定性測試，觀察 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 與 **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子的螢光變化趨勢是否與 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 與 **HF-7 α -U-EDIOL** 分子相同。

由圖 3-3 (a、d) 螢光光譜得知，**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子的螢光放射峰均位於 570-600 nm，且這兩個分子在不同 DMSO 與 H₂O 比例之混合溶劑中的螢光強度變化沒有 **3-HF** 來的複雜，變化趨勢也差不多，故在此章節一起描述。在 100% DMSO 中，溶劑極性最低，因此螢光強度最強，隨著水的比例增加，螢光團感受到整體環境極性增加，導致螢光強度慢慢下降，在 20% DMSO 水溶液中降至最低，**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 分子螢光強度差約 19 倍，**DBD-7 α -U-EDIOL** 分子則差約 13 倍；於 5% DMSO 水溶液中，發現螢光強度上升的情形，推測如同前述實驗組，對照組分子也形成螢光團在內的自組裝結構，導

致螢光團周圍環境變得較為疏水，因此螢光增強，但 **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子螢光增強的幅度大於 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 分子，原因如同前述，**DBD-7 α -U-EDIOL** 分子 linker 上之尿素官能基能提供分子和分子之間氫鍵作用力，使分子能堆疊得更加緊密，讓螢光團處於更疏水的環境，反觀 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 分子之甘胺酸官能基沒有此作用力，故於 5% DMSO 水溶液中，**DBD-7 α -U-EDIOL** 分子的螢光強度會比 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 分子來的高。

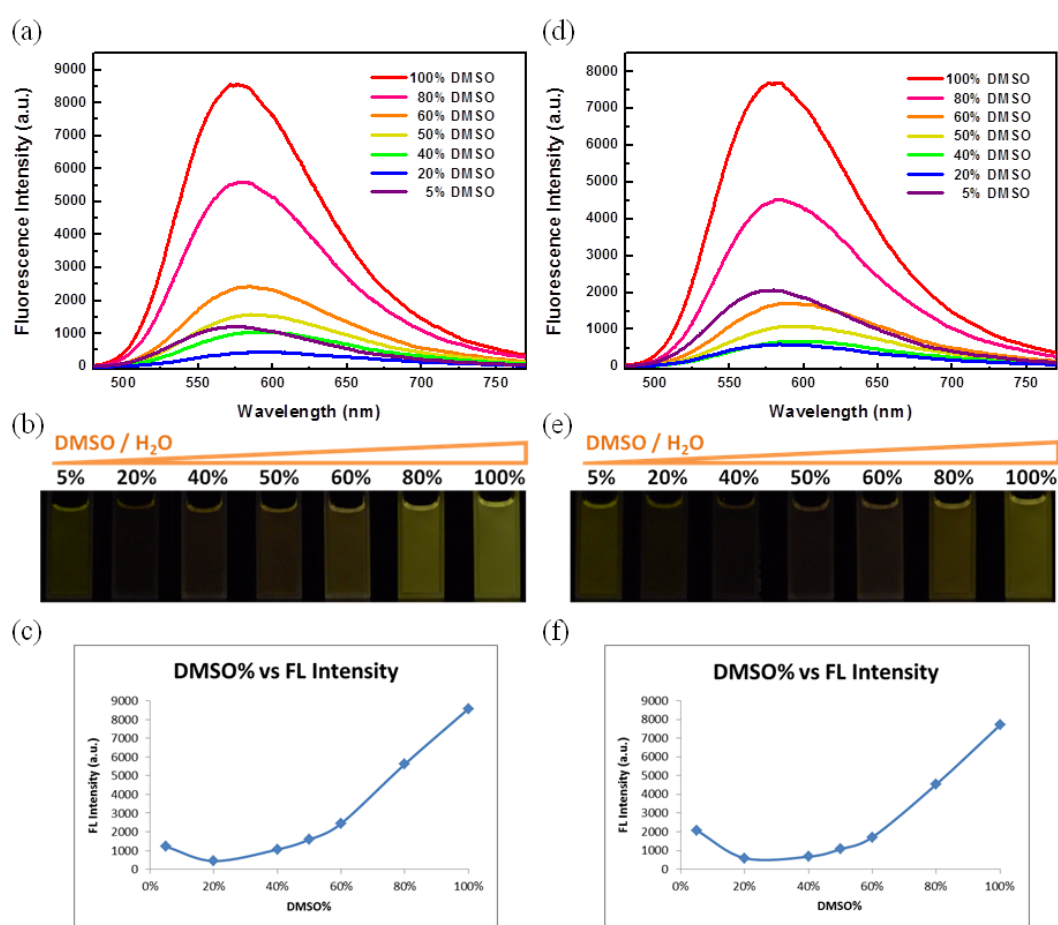


圖 3-3 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** (a-c) 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** (d-f) (10 μ M) 分子在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之 (a、d) 螢光光譜， $\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$ ， $\text{slit}_{\text{ex}} \& \text{slit}_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ ；(b、e) 相對應之螢光顯像圖，由左至右 DMSO 濃度分別為 5%，20%，40%，50%，60%，80%，100%；(c、f) 螢光強度圖。



3.1.3 HF-7 α -Gly-EDIOL 、 HF-7 α -U-EDIOL 、 DBD-7 α -Gly-EDIOL 、 DBD-7 α -U-EDIOL 相對臨界聚集濃度之比較

臨界微胞濃度 (critical micelle concentration, CMC) 為研究界面活性劑系統的一個重要指標，代表能夠形成微胞之最低濃度。界面活性劑在分子結構中同時具有親水端及疏水端兩部分，藉由將親水端朝向水，而疏水端朝向空氣，得以吸附在兩相間的介面上，從而降低介面表面能 (interfacial surface energy)，隨著界面活性劑在溶液中濃度增加，吸附在介面之界面活性分子也增加，故表面張力隨之下降，當介面吸附量達飽和，且溶液中也不再允許界面活性劑分子以單分子的形式存在時，界面活性劑便會尋求第二種熱力學穩定的方式存在於溶液中，即未能吸附在介面之分子會以數十至數百個單體的碳氫鍊互相聚集，將親水端朝外，而疏水端朝內以減少和水的接觸，這樣的聚集體稱作微胞 (micelle)，如圖 3-4 所示。

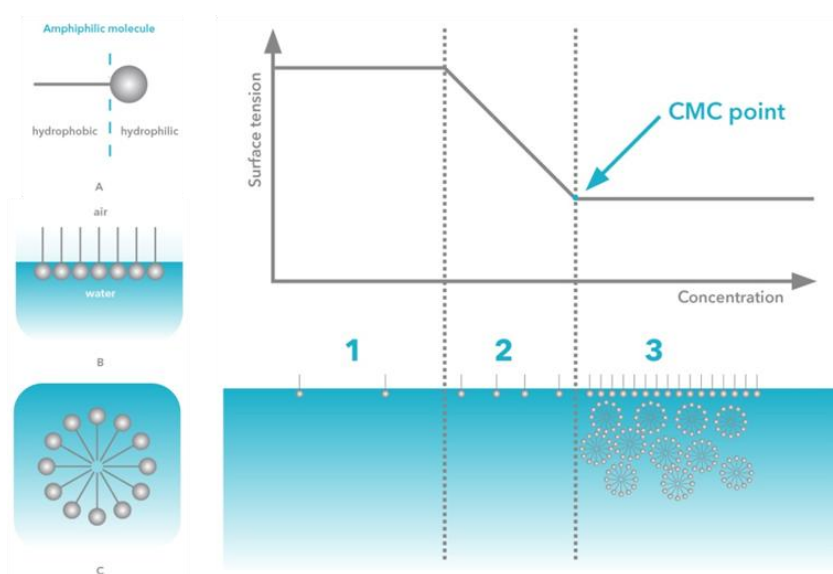


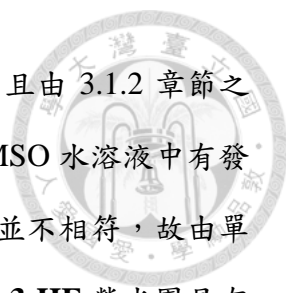
圖 3-4 左圖 (A) 兩性分子結構 (B) 兩性分子於空氣-水介面的排列方式 (C) 微胞結構。右圖為溶液表面張力對界面活性分子濃度做圖和微胞形成示意圖。¹⁰⁴

測定 CMC 的方法甚多，包括表面張力、導電度、滲透壓、光散射法、蒸氣壓、染料法與螢光偵測等。常用的為表面張力法，亦可用螢光的方法來測定 CMC，利用螢光試劑在微胞或為環境系統中放射性質之改變來達到偵測的目的。若用於描

述高分子與生物大分子之聚集行為則以臨界聚集濃度 (critical aggregation concentration, CAC) 稱之。

HF-7 α -Gly-EDIOL、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子在不同比例 DMSO/H₂O 溶劑中之螢光測試結果發現這四個分子均有螢光反轉的現象，根據以往的經驗，推測分子發生了聚集。為了解分子在什麼樣的濃度下會開始發生聚集，在此我們利用螢光分子中 **3-HF** 螢光團和 **DBD** 螢光團之多、單參數回應，單純以 ESICT/ESIPT 比值和單螢光放射強度作為極性指示劑，測定這些分子之 CAC，並比較由比例螢光和單螢光強度變化所測得 CAC 之差異性。將不同濃度之 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子於 5% DMSO 水溶液中進行螢光光譜的量測，再將 ESICT/ESIPT 比值或只有螢光強度和濃度作圖可得一曲線，如圖 3-5 (a-d) 所示。由於 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **HF-7 α -U-EDIOL** 分子 ESICT/ESIPT 比值均小於 1，以 ESIPT 放射為主，故由圖中下方螢光顯像圖顯示，除幾個低濃度樣品之外，其顏色普遍呈綠色，隨著濃度增加其螢光強度也逐漸增加；而 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子螢光強度也隨著濃度增加而增加，除幾個低濃度樣品之外，其顏色普遍呈黃色。而圖中兩直線相交點即為轉折點，**HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子轉折點濃度約為 5.5、4.9、24.2 和 33.0 μ M，整理如圖 3-5 (e) 所示。

若比較相同螢光團不同 linker 之 CAC 差異，預期 linker 修飾上尿素基團 (U) 的螢光分子因提供分子和分子之間氫鍵作用力，使分子更容易產生聚集，CAC 濃度會較低，而以 **3-HF** 為螢光團的分子有符合此預期，CAC 大小 **HF-7 α -Gly-EDIOL** > **HF-7 α -U-EDIOL**，且由 3.1.1 章節之螢光光譜定性實驗所推測，這兩個分子在濃度 10 μ M、5% DMSO 水溶液中有發生聚集，而當時聚集濃度均大於兩個分子的 CAC，間接驗證了當時的推測。但是，以 **DBD** 為螢光團的分子卻和預期相反，CAC 大小 **DBD-7 α -U-EDIOL** > **DBD-7 α -Gly-EDIOL**，推測原因為相較於比例螢光 (ESICT/ESIPT) 具有自我校正之功能，單螢光強度變化會受許多因素影響，所測得



之 CAC 濃度誤差就較大，再加上所得曲線之轉折點並不明顯，且由 3.1.2 章節之螢光光譜定性實驗所推測，這兩個分子在濃度 10 μM 、5% DMSO 水溶液中有發生聚集，而當時聚集濃度卻小於兩個分子的 CAC，和推測結果並不相符，故由單螢光強度變化所測得之 CAC 可信度並不高。由此實驗也凸顯了 **3-HF** 螢光團具有兩個放射峰之比例性 (ratiometric) 的優點。若比較相同 linker 不同螢光團之 CAC 差異，單純就水溶性而言，若分子水溶性越佳，越能容忍以自由狀態存在於水液中而不易聚集，因此在較低比例 DMSO 水溶液才會產生反轉，而由 3.1 章節之螢光光譜定性實驗得知含有 **3-HF** 和 **DBD** 螢光團之螢光分子的轉折點分別發生在 40% 和 20% DMSO 水溶液，說明含有 **3-HF** 螢光團之螢光分子水溶性較差，故預期相同溶劑條件下分子於較低濃度下就會發生聚集，所測得 CAC 濃度會較低。而實驗結果顯示這兩個螢光團均符合預期，CAC 大小 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** > **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** > **HF-7 α -U-EDIOL**，雖然說 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 之 CAC 較不具可信度，但其值和 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL** 這兩個分子的 CAC 差距較大，尚具有參考性。

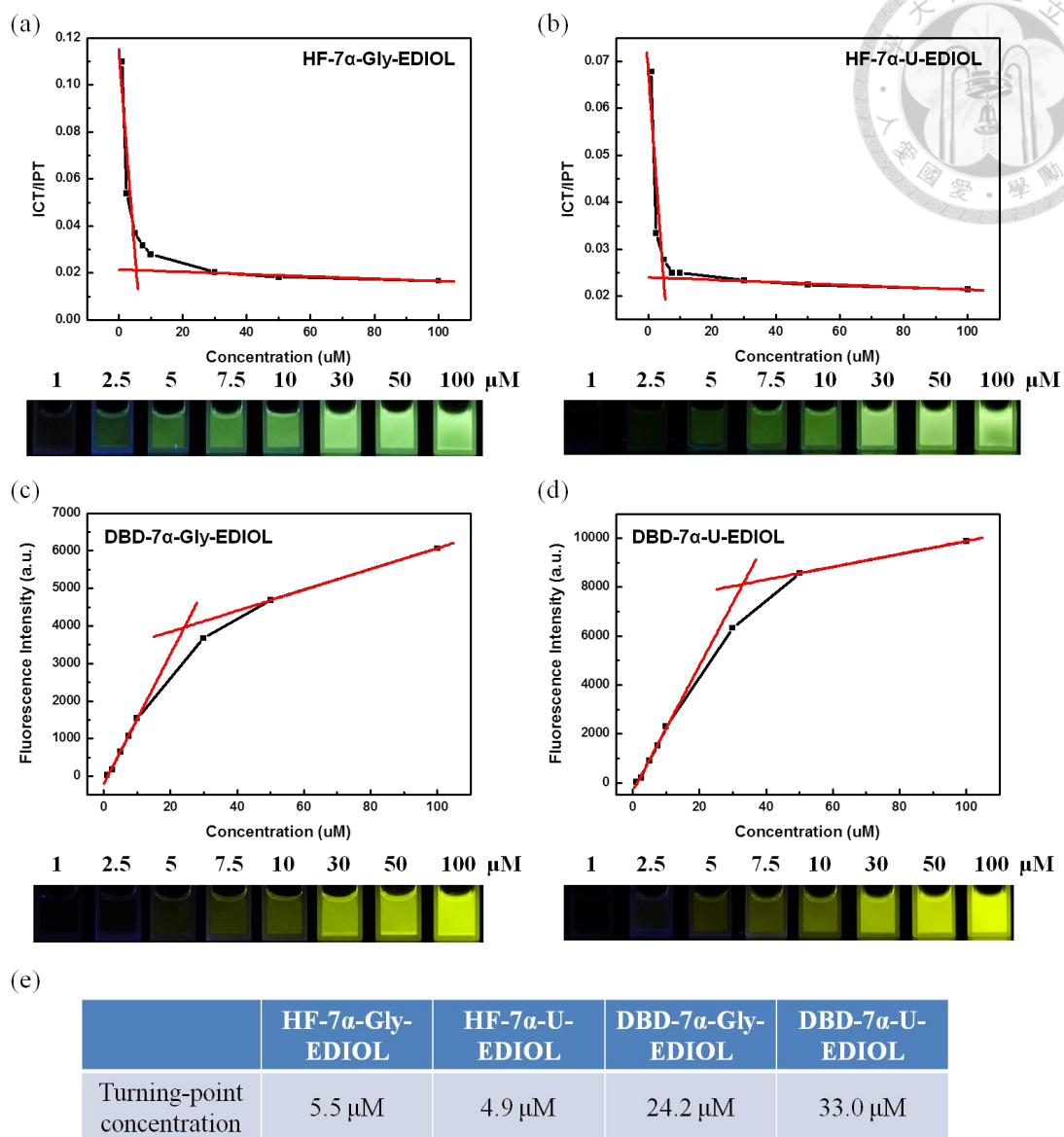


圖 3-5 不同濃度的 (a) HF-7α-Gly-EDIOL、(b) HF-7α-U-EDIOL、(c) DBD-7α-Gly-EDIOL 和 (d) DBD-7α-U-EDIOL 分子在 5% DMSO 水溶液中之螢光表現。(a) (b) 圖為 ESICT/ESIPT 比例 vs 濃度圖， $\lambda_{\text{ex}} = 356 \text{ nm}$ ， $\text{slit}_{\text{ex}} \& \text{slit}_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ 。(c) (d) 圖為螢光強度 vs 濃度圖， $\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$ ， $\text{slit}_{\text{ex}} \& \text{slit}_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ 。圖的下方為相對應之螢光顯像圖，由左至右濃度分別為 1，2.5，5，7.5，10，30，50，100 μM。(e) HF-7α-Gly-EDIOL、HF-7α-U-EDIOL、DBD-7α-Gly-EDIOL 和 DBD-7α-U-EDIOL 分子在 5% DMSO 水溶液中之轉折點濃度表。



3.1.4 螢光性質綜合討論與比較

首先比較螢光分子 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 彼此之間之螢光性質與分子結構的關聯性，再和先前實驗室所合成之螢光分子作綜合比較。

linker 修飾上不同官能基對於螢光性質之影響已在 3.1.1 和 3.1.2 章節分別做過探討，在此探討實驗組和對照組在相同 linker 下之螢光性質差異，含有 **3-HF** 螢光團之分子具有位於 435-442 nm (ESICT) 和 535-547 nm (ESIPT) 之雙螢光放射峰，受環境極性影響大而有相對比例變化，可達自我校正之功能，具有更高的可信度；而含有 **DBD** 螢光團之分子僅具有位於 572-600 nm 之單螢光放射峰，雖然此螢光團放射波長較長，在生物上的運用性較為廣泛，但螢光強度的改變可能受很多因素所影響，相較於 **3-HF** 螢光團可信度較低。除此之外，含有 **3-HF** 和 **DBD** 螢光團之分子的 ESICT/ESIPT 和螢光強度轉折點分別發生在 40% 和 20% DMSO 水溶液，說明含有 **3-HF** 螢光團之螢光分子水溶性較差，而水溶性越差越不能容忍以自由狀態存在於水溶液中，進而容易造成聚集，故在水中傾向聚集的程度為 **HF-7 α -Gly-EDIOL** > **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **HF-7 α -U-EDIOL** > **DBD-7 α -U-EDIOL**。以上四個螢光分子之螢光性質比較整理於表 3-1。

表 3-1 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 之螢光性質比較。

Sample	Absorption wavelength	Emission wavelength		Conversion point
HF-7 α -Gly-EDIOL	356 nm	ICT	IPT	40% DMSO
		435-442 nm	536-545 nm	
HF-7 α -U-EDIOL	356 nm	ICT	IPT	40% DMSO
		435-441 nm	535-547 nm	
DBD-7 α -Gly-EDIOL	442 nm	572-589 nm		20% DMSO
DBD-7 α -U-EDIOL		580-600 nm		

在蘇怡文學姊論文中，**HF-EDIOL**、**HF-7 α -EDIOL**、**HF-EDINH₂**、**HF-3-EDIGuid**、**HF-EDISO₄H**、**HF-7-EDISO₄H** 與 **HF-3-EDICO₂H** 這七個分子已經依雌二醇末端官能基、螢光團連接位置等分類作詳細的比較，且於 1.6 章節也簡單綜合整理了這七個分子的螢光性質，故只將 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL** 分子和相同由雌二醇 7 號位置連接螢光團的分子 **HF-7 α -EDIOL** 作比較，分子結構如圖 3-6 所示。由螢光光譜定性實驗可知，**HF-7 α -EDIOL** 分子和 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **HF-7 α -U-EDIOLU** 分子一樣也有發生螢光反轉的現象，ESICT/ESIPT 轉折點分別發生在 50%、20% 和 20% DMSO 水溶液，說明 **HF-7 α -EDIOL** 分子之水溶性比 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **HF-7 α -U-EDIOLU** 分子差，推測是因為在 linker 上修飾 Gly 和 U 這兩個親水性基團，藉由官能基上的質子供體與質子受體來增加和水之間的氫鍵作用力，進而提升了分子在水中之溶解度，這有達到我們原先設計在 linker 上修飾 Gly 和 U 這兩個親水性基團來增加分子水溶性的期望。除此之外，疏水性長碳鏈的 linker 少了和水之間的作用力，可使分子間堆疊得更好，使分子更加容易聚集，故在水中傾向聚集的程度依序為 **HF-7 α -EDIOL** > **HF-7 α -U-EDIOL** > **HF-7 α -Gly-EDIOL** (**HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **HF-7 α -U-EDIOL** 分子聚集程度的大小已在前段中討論過了)。

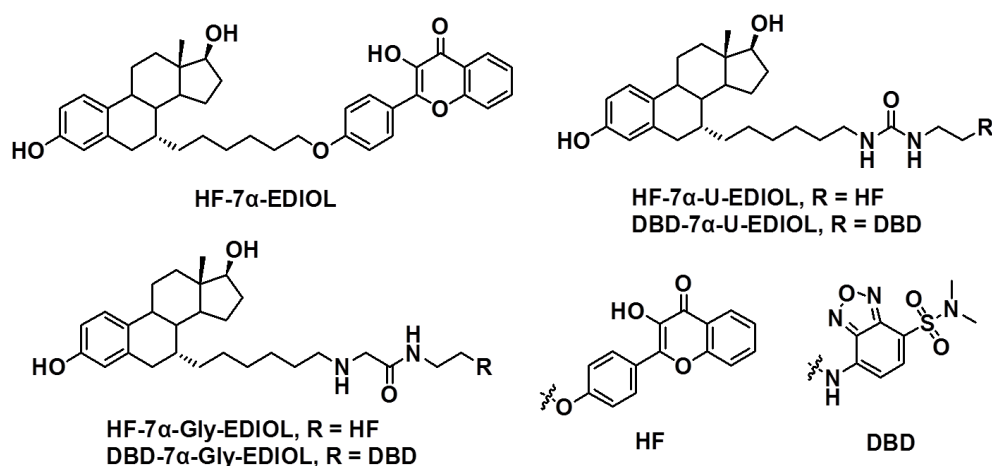


圖 3-6 雌二醇螢光分子 **HF-7 α -EDIOL**、**HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 之分子結構。



3.2 超結構之尺寸、表面電性與型態鑑定

實驗室先前所合成之 **HF-EDIOL**、**HF-7 α -EDIOL**、**HF-EDINH₂**、**HF-3-EDIGuid**、**HF-EDISO₄H**、**HF-7-EDISO₄H** 與 **HF-3-EDICO₂H** 分子，利用 TEM 或 SEM 解析超結構形態了解在 5% DMSO 水溶液中（濃度為 2×10^{-4} M）呈現的超結構型態不盡相同，有些聚集為球狀，如 **HF-EDIOL**、**HF-7 α -EDIOL**、**HF-3-EDIGuid**；有些則聚集成絲狀或管狀的，如 **HF-EDINH₂**、**HF-EDISO₄H**、**HF-3-EDICO₂H**；也有些聚集呈不規則形狀的，如 **HF-7-EDISO₄H**。由 3.1 章中 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 之螢光光譜定性實驗可知，這四個分子均有螢光反轉的現象，推測分子在水比例較高的 DMSO 水溶液中發生了聚集。為了證實此推論並且與先前螢光分子之聚集形態作比較，將 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 溶於不同比例的 DMSO 水溶液中，配製成 2×10^{-4} M，進行動態光散射 (dynamic light scattering, DLS)、表面電位 (zeta potential)、穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 實驗以確認其超結構型態。

3.2.1 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL**、**DBD-7 α -U-EDIOL** 之動態光散射與表面電位量測之結果

由於 DLS 實驗樣品適用濃度為 0.1 mg/mL - 40% w/w，換算成體積莫耳濃度是介於 1×10^{-4} M - 1×10^{-3} M，故將 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 配製成 2×10^{-4} M，溶於不同比例的 DMSO 水溶液，進行動態光散射實驗，確認分子是否有形成聚集。若有，則推算所形成之聚集於溶液狀態時的粒徑大小。

實驗結果如圖 3-7 所示，在 5% DMSO 水溶液 **HF-7 α -U-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 均可發現奈米等級大小的聚集，大小分別約為 80 nm 和 180 nm，與螢光光譜完全以 ES IPT 主導和螢光強度反升的結果相符，顯示確實可能形成螢光團在內的自組裝結構。而測得 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 之粒

徑大小到達微米等級，且分散係數 (polydispersity index, PDI) 很大，推測原因為在 5% DMSO 水溶液中從肉眼就可發現其溶液呈混濁狀，且靜置一段時間後，樣品瓶底部有沉澱，代表分子水溶性較差造成析出，故測出之粒徑大小偏大，且無法準確量測出在溶液狀態下分子聚集之大小。而在含較高濃度比例的 DMSO 水溶液，如 40%-100% DMSO 水溶液中，亦可量測到這四個分子有聚集的現象，然而其多分散係數 (polydispersity index, PDI) 都非常大，顯示在該濃度下之粒徑大小不一，大多是隨機組成的聚集，所得之數據可信度不高。

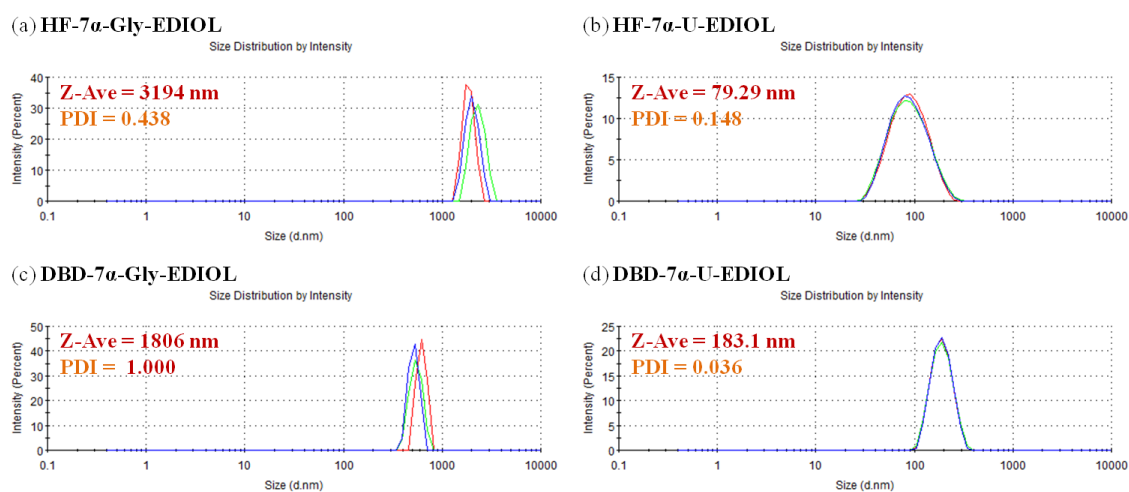



圖 3-7 (a) HF-7 α -Gly-EDIOL、(b) HF-7 α -U-EDIOL、(c) DBD-7 α -Gly-EDIOL 和 (d) DBD-7 α -U-EDIOL 於 5% DMSO 水溶液之粒徑大小分布 (分子濃度均為 2×10^{-4} M)。

由先前研究可知，若雌二醇 17 號位置上具有帶電性官能基，如胺基 (-NH₂)、羧酸基 (-COOH)、磺酸基 (-SO₃H) 和胍基 (guanidinium)，分子在形成自組裝結構時的位向可藉由進行表面電位 (zeta potential) 的量測實驗而確認，若分子形成螢光團端朝內雌二醇端朝外的自組裝結構，可量測到表面電位的存在；反之，則表面電位為 0；但若雌二醇 17 號位置上為非帶電性官能基，如羥基 (-OH)，則不管是螢光團端朝外還是雌二醇端朝外，量測的表面電位均為 0 (HF-EDIOL 和



HF-7 α -EDIOL)。故為了解分子在形成自組裝結構時的位向，將 HF-7 α -Gly-EDIOL、HF-7 α -U-EDIOL、DBD-7 α -Gly-EDIOL 和 DBD-7 α -U-EDIOL 進行表面電位的量測實驗，在濃度為 2×10^{-4} M 且溶劑為 5% DMSO 水溶液中，四者皆無表面電位存在，即表面電位均為 0 mV，再加上這四個分子雌二醇 17 號位置上均為羥基，故無法由表面電位量測實驗來證明分子聚集的位向，然而可依據先前研究分子 HF-EDINH₂、HF-3-EDIGuid、HF-EDISO₄H、HF-7-EDISO₄H 與 HF-3-EDICO₂H 之表面電位量測結果和 3.1 章節螢光光譜定性實驗，來推測這四個分子在形成自組裝結構之位向應該是螢光團朝內被包覆在疏水性環境內。

3.2.2 HF-7 α -Gly-EDIOL 、 HF-7 α -U-EDIOL 、 DBD-7 α -Gly-EDIOL 、 DBD-7 α -U-EDIOL 於穿透式電子顯微鏡之實驗結果

穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 擁有極高的穿透力及高解析度，其成像系統經由一系列電磁透鏡可放大數十萬至數百萬倍 (光學顯微鏡之最大有效放大倍率為一千倍)，不僅可以直接觀察奈米等級樣本，例如細菌、病毒、蛋白質、胞器或金奈米粒子等表面或內部結構，亦可觀看微米至奈米等級之自組裝結構，已成為化學、材料科學、化學工程與生物工程等領域上探究樣本形態的常用工具之一。由上述 HF-7 α -Gly-EDIOL、HF-7 α -U-EDIOL、DBD-7 α -Gly-EDIOL 和 DBD-7 α -U-EDIOL 之動態光散射實驗得知，在含水比例較高之 DMSO 水溶液中可形成奈米等級的自組裝結構，因此我們欲利用穿透式電子顯微鏡來確認螢光分子之聚集結構大小及形狀。

將 HF-7 α -Gly-EDIOL、HF-7 α -U-EDIOL、DBD-7 α -Gly-EDIOL 和 DBD-7 α -U-EDIOL 溶於 5% DMSO 水溶液中，配製濃度為 2×10^{-4} M 後，取 10 μ L 溶液滴於穿透式電子顯微鏡之專用銅網上，若樣品本身顏色對比明顯，不需進行染色即可直接觀測；但若顏色對比不夠清晰，例如樣品成像過淺時，則需進行染色以便觀測，在此我們選擇以含有重金屬之醋酸鈾鹽 (uranyl acetate, UA) 染劑來進行負染色，吸去染料靜置 20 分鐘待溶劑乾燥後即可進行穿透式電子顯微鏡之觀

測實驗。一般負染色的原理是利用重金屬鹽類，如 1-2% 磷鎢酸或 0.2-1% 醋酸鈷醃等染劑，包圍樣品進行染色，吸去染料待樣品乾燥後，樣品和銅網之凹陷處會鋪上一層薄薄的重金屬鹽類，而凸出的樣品處則沒有染料沉積，故會形成外深內淺的對比。此種負染效果變如同將透明物的邊緣塗黑，利用深色背景襯托出樣品之輪廓。但我們所合成之螢光分子本身溶液吸附染劑，故反而得到正染的效果，即為內深外淺的對比。

由穿透式電子顯微鏡觀測結果如圖 3-8 所示，在 5% DMSO 水溶液中，**HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 分子均呈現交聯狀自組裝結構，但 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 分子為球狀交聯，球狀大小不均一，最大約 400 nm，最小約 70 nm，而 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 分子則為不規則狀交聯，大小不均一或形成不規則形狀之原因推測為分子溶解度較差（因從肉眼就可發現其溶液呈混濁狀，且有沉澱產生），故在含水溶液中極欲傾向聚集在一起，因此聚集的速度就會很快，若聚集速度過快，分子便無法慢慢整齊堆疊，自然不易形成大小均一或有序形狀之超結構，也會造成交聯之情況。對照 DLS 量測結果，**HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 分子由 DLS 測得之粒徑偏大，原因除了上述所解釋，也可能是因為所形成之超結構為球狀交聯，故儀器所測得之大小為交聯體而非分散之球狀結構，而每個交聯體大小也不一樣，才會造成 PDI 值非常大。**HF-7 α -U-EDIOL** 分子於 5% DMSO 水溶液中呈現不規則形態之聚集，大部分超結構之大小均小於 100 nm，此大小和 DLS 所測得之粒徑大小相符。而圖中可見部分長方形塊狀且顏色較深也較大之結構，推測為 UA 染劑中之鹽類而非分子所形成的聚集。到目前為止，可發現有機化合物要形成特定形狀，如球狀、柱狀、纖維狀、網狀等形狀的聚集並不容易，大部分都是隨意聚集成一團團的形態，對水溶解度太好或太差都不易形成有序之聚集結構。最後，**DBD-7 α -U-EDIOL** 分子於 5% DMSO 水溶液中之聚集形態為完美的球狀，大小較為均一，約為 135-160 nm，小於 DLS 所測得之 183.1 nm 粒徑大小，是因為 TEM 為樣品乾燥後之狀態，而 DLS 則代表超結構於溶液中之形態，所得之粒子半徑為水合半徑，故會大於 TEM 所得之粒徑大小。

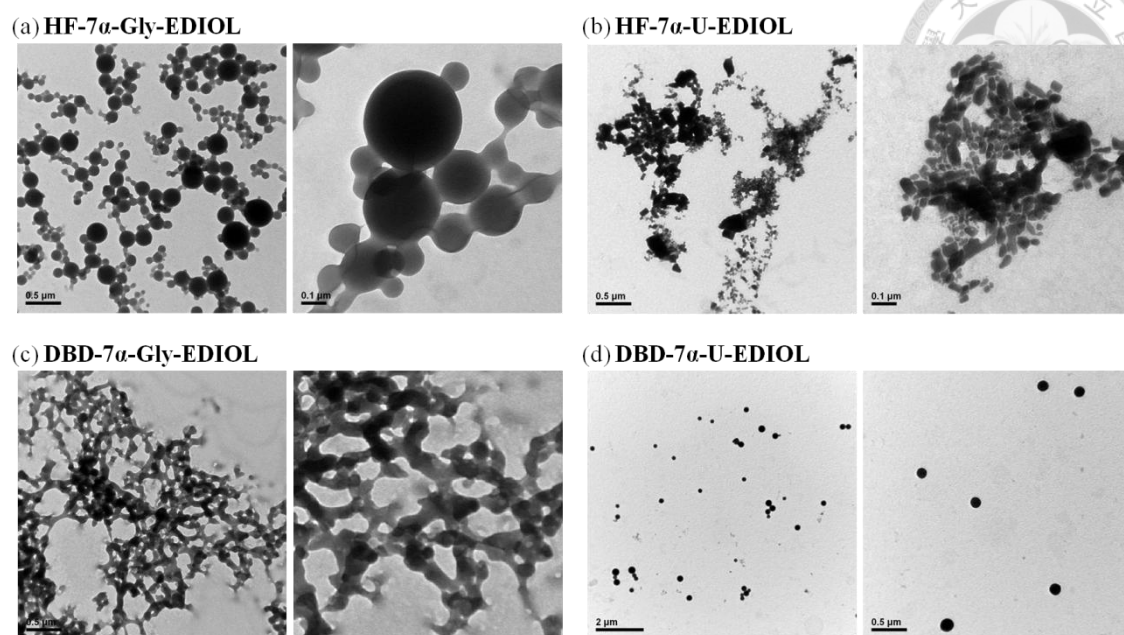


圖 3-8 (a) **HF-7 α -Gly-EDIOL**、(b) **HF-7 α -U-EDIOL**、(c) **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 (d) **DBD-7 α -U-EDIOL** 於 5% DMSO 水溶液之穿透式電子顯微鏡觀測結果 (分子濃度均為 2×10^{-4} M)。左圖均為倍率較小之圖像，右圖均為倍率較大之圖像。

3.2.3 超結構型態鑑定之綜合討論與比較

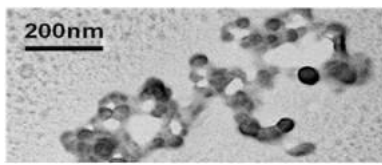
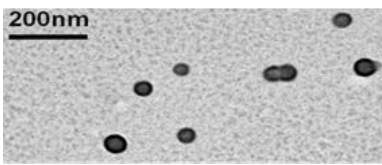
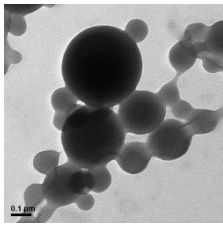
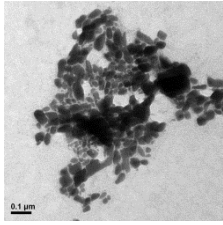
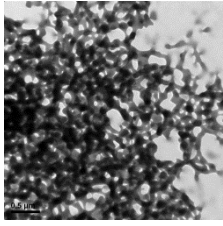
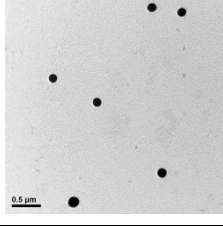
經由 DLS、zeta potential 和 TEM 之超結構鑑定實驗結果整理如表 3-2 所示。由於在配置濃度 2×10^{-4} M 之 5% DMSO 水溶液時，從肉眼就可發現 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 之溶液均呈混濁狀，且靜置一段時間後樣品瓶底部有沉澱，代表分子水溶性較差造成析出，**DBD-7 α -U-EDIOL** 溶液則是呈混濁狀但沒有沉澱產生，而 **HF-7 α -U-EDIOL** 分子是四個分子中唯一澄清的溶液，故推測在濃度 2×10^{-4} M 下，四個分子之對水溶解度依序為 **HF-7 α -U-EDIOL** > **DBD-7 α -U-EDIOL** > **HF-7 α -Gly-EDIOL** \approx **DBD-7 α -Gly-EDIOL**。綜合 DLS、zeta potential 和 TEM 之實驗結果，最後排序出這四個螢光分子在水中傾向聚集的程度：**HF-7 α -Gly-EDIOL** \approx **DBD-7 α -Gly-EDIOL** > **DBD-7 α -U-EDIOL** > **HF-7 α -U-EDIOL**。相較於先前螢光性質綜合討論與比較中，只由 ESICT/ESIPT 比例和螢光強度之轉折點間接推論之排序 **HF-7 α -Gly-EDIOL** > **DBD-7 α -Gly-EDIOL**

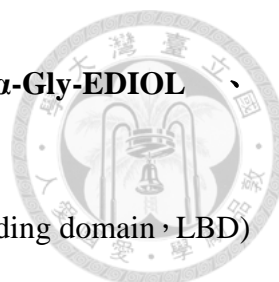
和 **HF-7 α -U-EDIOL** > **DBD-7 α -U-EDIOL**，此排序較為準確也較具可信度，因為是由直接觀測所得之結果。而四個螢光分子在 5% DMSO 水溶液中之聚集大小依序為 **HF-7 α -Gly-EDIOL** \approx **DBD-7 α -Gly-EDIOL** > **DBD-7 α -U-EDIOL** > **HF-7 α -U-EDIOL**。

在 1.6 章節中已經整理了 **HF-EDIOL**、**HF-7 α -EDIOL**、**HF-EDINH₂**、**HF-3-EDIGuid**、**HF-EDISO₄H**、**HF-7-EDISO₄H** 與 **HF-3-EDICO₂H** 這七個分子之 DLS、Zeta potential、TEM 等超結構形態鑑定結果，且蘇怡文學姊論文中也依雌二醇末端官能基、螢光團連接位置等分類對於自組裝結構之影響作詳細的比較，故在此只將 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL** 分子和雌二醇 17 號位置具有相同羥基之螢光團的分子 **HF-7 α -EDIOL**、**HF-EDIOL** 作比較，探討在 linker 上修飾與否和長度之改變對於分子聚集型態之影響。由 DLS 和 TEM 結果可知，四者皆為球狀聚集，代表最重要影響分子聚集形態的因素為雌二醇 17 號位置上之官能基團，而 linker 修飾得基團和長度則是影響分子聚集的大小，長度越長聚集大小越大，故後兩者之聚集大小比前兩者還大。

表 3-2 HF-EDIOL、HF-7 α -EDIOL、HF-7 α -Gly-EDIOL、HF-7 α -U-EDIOL、DBD-7 α -Gly-EDIOL 和 DBD-7 α -U-EDIOL 於 5% DMSO 水溶液中 (分子濃度均為 2×10^{-4} M) 之超結構形態鑑定結果整理表。



	DLS (nm)	Zeta (mV)	TEM	Diameter (nm)
HF-EDIOL	64.9	0		60~70
HF-7α-EDIOL	67.8	0		60~70
HF-7α-Gly-EDIOL		0		70-400
HF-7α-U-EDIOL	79.29	0		~80
DBD-7α-Gly-EDIOL		0		< 100
DBD-7α-U-EDIOL	183.1	0		135~160




3.3 HF-7 α -Gly-EDIOL 、 HF-7 α -U-EDIOL 、 DBD-7 α -Gly-EDIOL 、

DBD-7 α -U-EDIOL 之細胞實驗測試

由雌性激素受體 (estrogen receptor) 配體結合域 (ligand binding domain, LBD) 與雌二醇結合時的 X-ray 結晶得知，雌二醇主要是藉由 3 號和 17 號位置上的羥基和雌性激素受體 LBD 上的胺基酸形成的氫鍵作用力來結合。而我們螢光分子 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 的雌二醇上，均保有 3 號和 17 號位置上的羥基，便思考這四個分子是否能發展為雌二醇螢光探針，藉由螢光團隨著環境極性的不同在與雌性激素受體結合前後造成螢光波長比例或螢光強度之改變來追蹤感應雌性激素受體作用的路徑，提供即時檢測造影之工具，故將這四個分子進行體外 (*in vitro*) 生物實驗之測試。選用的細胞株為 MCF-7 細胞株，因 MCF-7 細胞為一表現雌性激素受體 ER α 之細胞株，可作為研究乳癌細胞作用機制及雌二醇螢光探針造影測試的良好細胞。

由於光學螢光顯微鏡屬於傳統顯微鏡，受到光波繞射的限制，使它無法提供無限放大的能力而停留在平面成像階段。螢光染色之樣品由於景深使得螢光顯微鏡無法僅觀測某一段層，導致螢光影像常顯得一團模糊，無法區分染色的部位位於何處，比如是在細胞膜上或是細胞內部。於是想進一步利用解析度較高的雷射掃描式共軛焦電子顯微鏡 (laser scanning confocal microscopy) 當作觀測工具。

在製樣之前，分子濃度和培養時間已簡單先利用倒立式螢光顯微鏡進行最佳化。將 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 溶於 DMSO 配製成 1×10^{-2} M，再利用細胞培養基溶液將濃度稀釋至 50 μ M，而後加入貼附於 12 孔盤、濃度為 5×10^4 個/well 的 MCF-7 細胞中，於 37 $^{\circ}$ C 培養 12 小時後進行製樣，最後再以雷射掃描式共軛焦電子顯微鏡觀測結果。由圖 3-9 可清楚看出含有 Gly linker 之 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 分子皆能進入細胞，且大多分布在細胞質當中。由可見光穿透影像圖清楚可見黑色球狀分佈在細胞核周圍一群，且螢光放射位置均和黑色球狀疊合得很好，球狀大小約為 1-2 μ m，和 DLS 量測結果大致相符，故推測分子是



以聚集的形式經由胞吞作用 (endocytosis) 進入細胞當中。相較於含有 Gly linker 分子,含有 U linker 之 **HF-7 α -U-EDIOL** 分子其螢光強度非常弱,弱到幾乎看不見,可以說是分子幾乎不進入細胞;而 **DBD-7 α -U-EDIOL** 分子隱約可見黃色螢光,代表還是有少量的分子進入細胞中。綜合 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 四種螢光分子於雷射掃描式共軛焦電子顯微鏡之觀測結果,進入細胞能力之排序為 **HF-7 α -Gly-EDIOL** \approx **DBD-7 α -Gly-EDIOL** $>$ **DBD-7 α -U-EDIOL** $>$ **HF-7 α -U-EDIOL**, linker 修飾上不同官能基造成分子進入細胞能力差異之原因目前還並不清楚,可能要進行更多生物上的測試才能釐清分子和細胞作用之機制和進入細胞之方式,但至少我們已經先確認 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 這兩個分子在生物的應用上是有潛力的。若要進一步確認 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 分子是否以胞吞作用方式進入細胞中,可利用流式細胞儀分析比較在高溫和低溫下分子進入細胞的情況,由於胞吞作用過程中需要能量,在低溫或有生理功能抑制劑(如疊氮化鈉, NaN_3) 存在下會抑制或破壞 ATP 的生成,胞吞作用的速率就會有差異,進而造成分子進入細胞的量會有所不同。

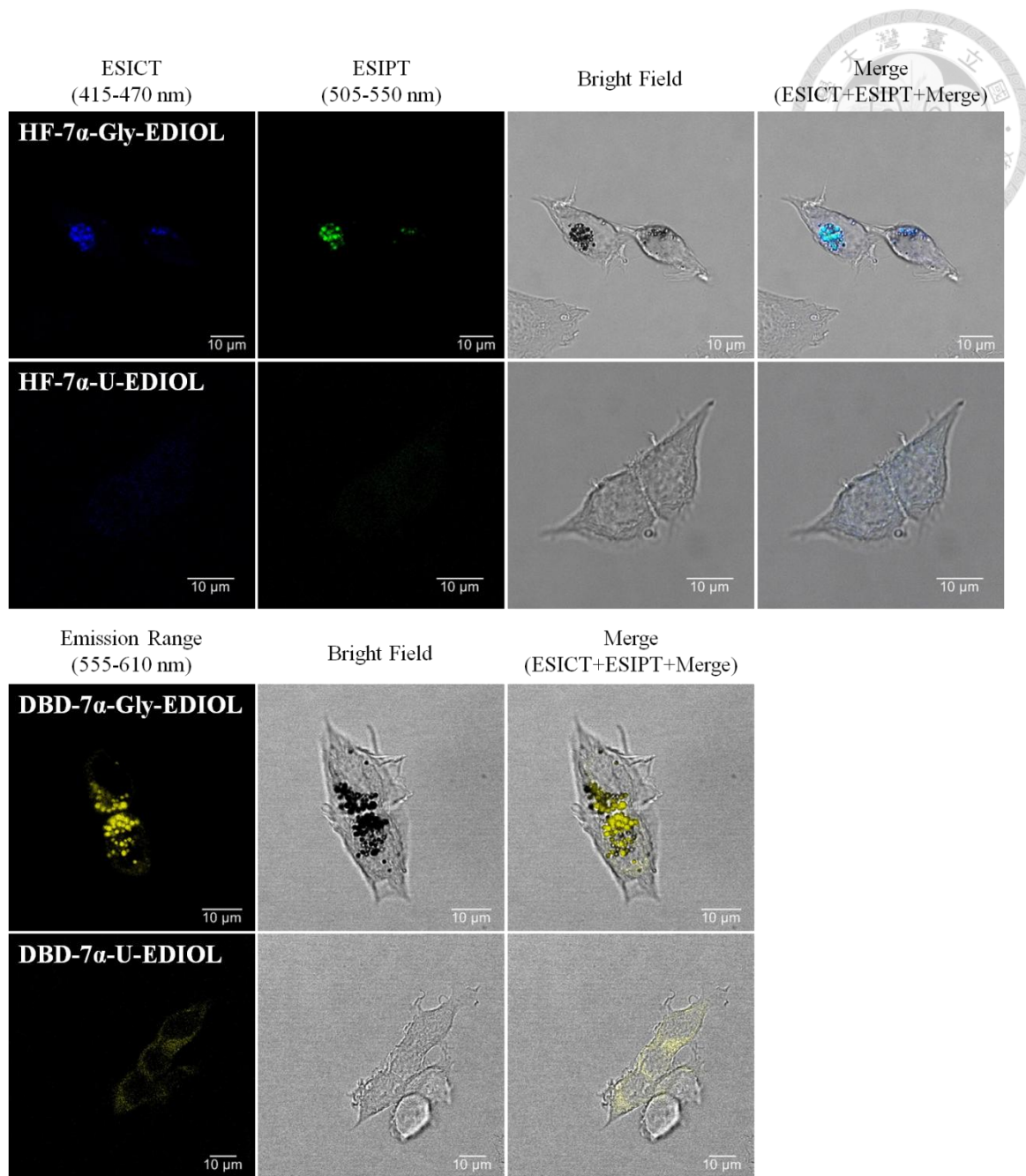


圖 3-9 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 對 MCF-7 乳癌細胞之雷射掃描式共軛焦電子顯微鏡影像圖。圖中波長為收光範圍，上方第一欄為收取 415-470 nm 之 ESICT 螢光放射峰；第二欄為收取 505-550 nm 之 ESIPT 螢光放射峰；第三欄為可見光穿透影像 (Bright field)；第四欄為前三欄之疊合 (ESICT 與 ESIPT 之激發波長均為 405 nm)。下方第一欄為收取 555-610 nm 之螢光放射峰；第二欄為可見光穿透影像；第三欄為為前二欄之疊合 (激發波長為 405 nm)。由上至下依序為 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL**、**DBD-7 α -Gly-EDIOL**、**DBD-7 α -U-EDIOL** 分子。

第四章 總結




我們成功合成出實驗組 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL** 和對照組 **DBD-7 α -Gly-EDIOL**、**DBD-7 α -U-EDIOL** 之雌二醇螢光分子，探討分子結構的改變對於螢光性質和聚集形態之影響，並利用對環境極性敏感的 **3-HF** 和 **DBD** 螢光團之比例螢光回應和螢光強度變化，探測螢光團所處的周圍介質環境，作為分子形成聚集與否的初步判定。

由螢光光譜定性實驗可知，實驗組 **HF-7 α -Gly-EDIOL**、**HF-7 α -U-EDIOL** 和對照組 **DBD-7 α -Gly-EDIOL**、**DBD-7 α -U-EDIOL** 分子之 **ESIPT/ESICT** 比例和螢光強度有反轉的現象，前兩者在水佔較高比例溶劑中皆完全以 **ESIPT** 放射峰為主導，後兩者隨水的比例上升，螢光強度先降後升，顯示這四個分子一開始是處於分散的狀態，隨水的比例增加，分子會藉由親疏水作用力形成自我組裝結構，形成雌二醇端朝向水溶液，而螢光團端朝內堆疊在一起，使螢光團處於較疏水環境。

由 **DLS** 實驗可知，於濃度 2×10^{-4} M 之 5% **DMSO** 水溶液，**HF-7 α -U-EDIOL** 和 **DBD-7 α -U-EDIOL** 均可發現奈米等級大小的聚集，大小分別約為 80 nm 和 180 nm，但 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 之粒徑大小到達微米等級，然而其 **PDI** 都非常大，所得之數據可信度不高。

依先前研究結果歸納得知，雌二醇 17 號位置之官能基會影響分子堆疊的型態，若雌二醇 17 號位置為羥基 (-OH)，聚集結構為球狀；若為高極性帶電基團則聚集結構為管柱狀或絲狀，由此可預測本論文所合成的四個螢光分子之聚集形態為球狀，因四者的雌二醇 17 號位置上均為羥基。由 **TEM** 實驗結果可清楚得知分子堆疊形態：**HF-7 α -Gly-EDIOL** 聚集為球狀，但彼此交聯在一起，大小約 70-400 nm；**HF-7 α -U-EDIOL** 只觀測到大小不一的不規則形狀（類圓球狀），尺寸直徑約落在 80 nm 左右，可能因水溶性最好而不易聚集形成特定形態，因此認定 **HF-7 α -U-EDIOL** 之自組裝能力為四個分子中最弱；**DBD-7 α -Gly-EDIOL** 聚集為不規則形狀，一樣也是彼此交聯在一起，因分子溶解度較差（因從肉眼就可發現其溶



液呈混濁狀，且有沉澱產生)，故在含水溶液中極欲傾向聚集在一起，因此聚集的速度就會很快，若聚集速度過快，分子便無法慢慢整其堆疊，自然不易形成大小均一或有序形狀之超結構，也會造成交聯之情況，而交聯狀匯集處呈類圓球狀，大小約小於 100 nm；最後 **DBD-7 α -U-EDIOL** 聚集為完美的球狀，大小較為均一，約為 135-160 nm，和 DLS 所測得之粒徑大小大致符合。四個螢光分子在水中傾向聚集的程度：**HF-7 α -Gly-EDIOL** \cong **DBD-7 α -Gly-EDIOL** > **DBD-7 α -U-EDIOL** > **HF-7 α -U-EDIOL**；而在 5% DMSO 水溶液中之聚集大小依序為 **HF-7 α -Gly-EDIOL** \cong **DBD-7 α -Gly-EDIOL** > **DBD-7 α -U-EDIOL** > **HF-7 α -U-EDIOL**。

由生物實驗測試可知，相較於含有 U linker 分子，含有 Gly linker 之 **HF-7 α -Gly-EDIOL** 和 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** 均能進入細胞，且大多分布在細胞質當中。綜合這四種螢光分子於雷射掃描式共軛焦電子顯微鏡之觀測結果，進入細胞能力之排序為 **HF-7 α -Gly-EDIOL** \cong **DBD-7 α -Gly-EDIOL** > **DBD-7 α -U-EDIOL** > **HF-7 α -U-EDIOL**。



第二部分

發展可快速偵測光氣之螢光探針

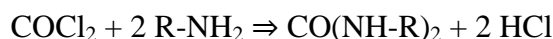
第一章 緒論



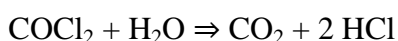
光氣是具有歷史意義和當前工業重要性的高反應性親電氣體。歷史上，這是第一次世界大戰中最致命的化學武器 (chemical weapon)，據估計，在此戰爭因毒氣死亡的人，有 80% 是因暴露於光氣下造成的。^{105,106} 目前，光氣用於製造染料、醃氯 (acid chlorides)、異氰酸酯 (isocyanates)、聚碳酸酯 (polycarbonates)、聚氨酯 (polyurethanes)、氨基甲酸酯 (carbamates)、藥物和相關農藥等，還可以用在冶金上，如此大的應用性使其全球產量估計超過 50 億磅。¹⁰⁷ 由於工業事故中，光氣外洩導致的死亡人數和大規模疏散，提醒人們它仍然是最致命的化學品之一。¹⁰⁸ 最近，光氣產生的肺部毒性可做為成人呼吸窘迫綜合症中滲透性肺水腫研究的有用模型。除了直接損傷呼吸道的細胞或組織，越來越多的證據表明，暴露於光氣會引發一系列炎症細胞因子和其他介質，最終導致肺微血管通透性增加和水腫形成。^{109,110} 因此，許多研究已經評估了人體暴露於光氣的治療策略，同時也可能可以應用在成人呼吸窘迫綜合症患者上。

1.1 光氣介紹

光氣是一種高反應性氣體，能夠以氧化物的方式損害各種生物材料，其活性來自至少兩個單獨的化學反應，包括醃基化 (acylation) 和水解 (hydrolysis)。醃基化是重要且快速發展的機制，光氣會與組織大分子中之親核基，例如胺基、羥基和硫醇基等產生反應。^{111,112} 光氣與胺基化合物 (R-NH₂) 進行醃化反應之反應式如下：



醃基化會引起蛋白質和脂質的變性、膜結構的不可逆改變和酵素和其他細胞功能的破壞。暴露於光氣會消耗肺組織中親核體，特別是穀胱甘肽 (glutathione)，因此穀胱甘肽的補充似乎可以防止光氣誘導的損傷。¹¹³⁻¹¹⁸ 除了醃基化之外，光氣被水解可形成 HCl，反應式如下：



鹽酸的形成發生在潮濕的黏膜上，¹¹¹ 由於光氣的水溶性有限，生物組織暴露於光氣中不可能產生大量的 HCl。然而，在與眼睛、鼻咽和呼吸道的濕膜接觸後會形成少量 HCl，在光氣暴露濃度大於一定程度時會立即引起發炎和造成不適。

光氣接觸到皮膚和眼睛或被人體吸入後會產生毒理作用：與液體光氣直接接觸會引起皮膚和眼睛的灼傷；當接觸氣體濃度大於 3 ppm 會立即引起眼睛和黏膜的刺激和疼痛；吸入則可能會引起支氣管和肺泡結構發炎、正常肺部結構破裂、肺水腫延遲出現。而光氣暴露引發的症狀分為立即和延遲發作兩種：立即發作的症狀主要是由於黏膜的刺激，這些症狀的嚴重程度與蒸汽濃度有關：大於 0.3 ppm 會刺激咽喉；大於 0.4 ppm 會刺激眼睛；大於 4.8 ppm 會導致咳嗽。¹¹⁹⁻¹²¹ 延遲發作症狀是由於肺水腫和呼吸衰竭相關的深層組織損傷，而損害的程度主要取決於劑量而不是濃度，^{122,123} 人類的平均致死劑量估計約為 500 ppm/min，人體對不同急性光氣暴露劑量的反應如表 1-1 所示。¹²⁴ 動物對低光氣濃度 (0.1 至 0.2 ppm) 的亞慢性暴露可能引起末端細支氣管發炎和增厚、增加肺置換體積、¹²⁵ 降低對感染和腫瘤細胞注射的抵抗力。¹²⁶

表1-1 人類對不同急性光氣暴露劑量的反應。¹²⁴

Dose	Response
1,300 ppm/min	100% mortality rate
500 ppm/min	50% mortality rate
300 ppm/min	1% mortality rate
150 ppm/min	Overt pulmonary edema
50-150 ppm/min	Clinically latent interstitial inflammation
25-50 ppm/min	Subclinical biochemical alterations
<25 ppm/min	"Harmless"

光氣吸入後的臨床情況可能會有很大差異，因為光氣濃度大於3 ppm會引起眼睛和上呼吸道直接刺激，而劑量大於150 ppm/min的會導致肺水腫延遲出現，甚至



死亡。因此，根據暴露條件，可能會出現各種主要症狀和症狀的組合，如表1-2所示。¹²⁴

表1-2 不同光氣暴露條件產生的症狀。¹²⁴

Exposure Examples	Odor Perception	Immediate Irritation	Delayed Onset of Pulmonary Edema	Death
1 ppm × 20 min	-	-	-	-
1 ppm × 150 min	-	-	10 hrs post-inhalation	-
1.3 ppm × 400 min	-	-	7 hrs post-inhalation	30 hrs post-inhalation
5 ppm × 5 min	+	+	-	-
50 ppm × 5 min	+	+	5 hrs post-inhalation	-
100 ppm × 5 min	+	+	3 hrs post-inhalation	24 hrs post-inhalation
300 ppm × 2 min	+	+	-	Within minutes

光氣在高濃度時具有刺激性的特殊氣味，通常被描述為發霉乾草或綠色玉米的氣味，但是在低於氣味識別閾值（約0.4-1.5 ppm）的濃度已具毒性作用，¹²⁷且光氣氣味又可被許多其他氣味掩蓋，故無法藉由氣味識別來預先防止光氣暴露。

由於暴露於光氣是無法預防的，所以暴露後的治療方式就很重要。吸入較高的光氣劑量（例如，150 ppm/min）會導致立即的生物化學變化，導致空氣-血液屏障的改變，但可能經過幾個小時後，直到血管外累積足夠的液體才會產生肺水腫的體徵和症狀，故對光氣暴露受害人治療的主要目標是於潛伏期間，在臨床水腫發展之前阻止光氣誘導的炎症性級聯（cascade）。然而，光氣暴露的具體解毒劑是未知的，所以只能針對引發的症狀去做暴露後的早期治療，通常稱為預防性治療，雖然預防更正確地是指在暴露發生之前給予的治療。預防性治療具體治療方法，包括類固醇（steroids）、布洛芬（ibuprofen）、NAC（*N*-acetyl cysteine）或正壓通氣（positive airway pressure ventilation）。前三種為臨床上常用的消炎藥物，而正壓通氣則是以物理機械的方式減少液體積聚，^{128,129}穩定肺泡內表面活性劑膜並抑制動靜脈分流，¹³⁰來預防光氣引起的肺水腫，不過不是所有的光氣暴露受害者都適用這種治療方式。



1.2 光氣螢光探針之發展與其偵測機制

光氣是一種高毒性和高活性的氣體，在工業上使用需求量大，若一旦發生外洩意外，暴露濃度大於一定程度時會立即引起發炎和造成不適，嚴重的話甚至造成死亡，但有時吸入致命濃度的光氣人體也不會立即有反應，反而是在數小時後才會開始出現症狀，又人體對於光氣氣味識別閾值低，當能聞到其刺激性氣味時，已經不知道暴露在高濃度下多長時間了，若能在暴露前事先感測到光氣濃度已超越安全閾值，便能降低很多傷害，故光氣感測的發展越來越受到重視。早期常用光氣感測的方法通常為電化學或是以遠程光譜為基礎的檢測技術，¹³¹⁻¹³³而利用光學探針的感測方式則是非常少見。¹³⁴近年來，活性的發色團 (chromophores) 或螢光團 (fluorophores) 常用來感測其他化學試劑，¹³⁵⁻¹³⁹利用吸收或螢光的變化來達到檢測的目的，此方法具有方便、簡單、快速又可靠等優點。

2007年Rudkevich教授及其研究團隊是第一個將螢光感測的方式應用在光氣檢測上，¹⁴⁰其設計出兩個均具有香豆素 (coumarin) 螢光團的螢光分子，而其中一個分子的放射光譜會和另一個分子的吸收光譜重疊，在距離夠近且位向符合的情況下分別可作為能量供體和受體形成螢光共振能量轉移 (FRET) 系統，如圖1-1 (a) 所示。當光氣存在於系統中時，其作為交聯劑 (cross-linking agent)，兩個分子會和同一光氣分子各進行一次加成-離去 (addition-elimination) 反應而連接在一起，如此便拉近兩個螢光團的距離，若以供體最大吸收作激發，能量會藉由FRET轉移至受體，此時系統會以受體的螢光放射為主 (464 nm)；當光氣不存在時，兩個分子無法以光氣為架橋連接在一起而分散在溶劑中，若以供體最大吸收作激發，因兩個螢光團相距太遠，能量無法藉由FRET轉移至受體，此時系統只會放射出供體的螢光 (424 nm)，故隨著光氣濃度增加，供體424 nm螢光放射峰會逐漸下降，而受體464 nm螢光放射峰會逐漸上升，如圖1-1 (b) 所示，藉由觀察供、受體的螢光放射強度變化來達到光氣偵測的目的。

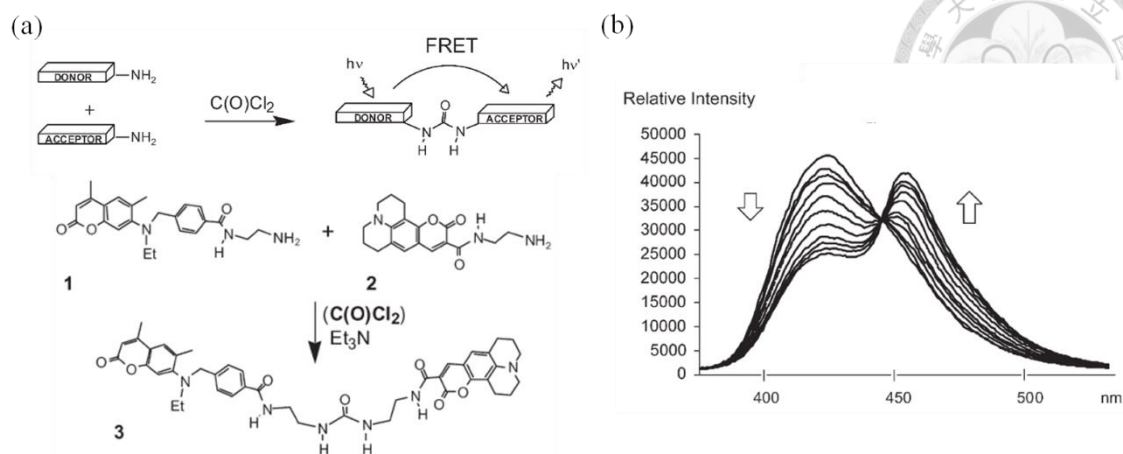


圖1-1 (a) 上圖為以FRET為基礎的光氣感測系統示意圖，下圖為兩個螢光分子與光氣反應前後分子結構圖。(b) 光氣感測系統進行光氣滴定 (0.03-5 eq) 實驗之螢光光譜圖， $\lambda_{ex} = 343 \text{ nm}$ (箭頭代表隨著光氣濃度增加螢光強度的變化)。兩個螢光分子溶於氯仿中，濃度為 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ，以1:1先混合在一起，再加入TEA (10 equiv.)，然後進行滴定實驗。¹⁴⁰

自2007年後陸續發展的代表性光氣螢光探針整理如表1-3所示，¹⁴⁹大部分的探針均以o-phenylenediamine (OPD) 為反應基團，和光氣反應後分子結構的改變影響了螢光團的螢光性質，造成螢光波長位移的現象，這種機制的光氣探針之反應速率和靈敏度分別依賴於光氣介導的醯基化反應的速率和探針與反應產物之間的螢光信號對比度。這些代表性光氣螢光探針最低偵測極限(limit of detection, LOD) 從奈莫耳 (nanomolar) 至微莫耳 (micromolar) 的範圍；反應速率從幾秒內至20分鐘，且大部分對光氣是有選擇性。儘管有些創新，但在靈敏度、反應速率和選擇性方面優化的螢光探針的開發還具有一些挑戰。

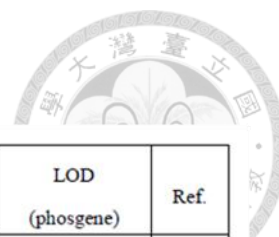


表1-3 代表性光氣螢光探針之整理表。

Probe structure	Fluorophore	Response time	Sensitivity	Selectivity	LOD (phosgene)	Ref.
	Coumarins	Within seconds	/	Yes	5 μ M	140
	Rhodamine-(deoxy) lactam	/	/	Yes	50 nM (triphosgene)	141
	O-amino cinnamic acid	/	/	/	1 nM	142
	Pyronin	Several seconds	580-fold	Yes	20 nM (triphosgene)	143
	7-Nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazole	150s	/	Yes	7 nM	144
	Coumarin	Less than 30 s	533-fold	Yes	3 nM	145
	Naphthalimide	20 min	/	Yes	1.3 nM (triphosgene)	146
Commercial <i>Compur Monitor</i> phosgene badge	/	60 s	/	No ¹²	10 ppm/min	147
Commercial <i>Morphix Technologies</i> badge	/	60 s	/	No ¹³	0.5 ppm/min (in gas case)	148
	BODIPY	1.5s (in solution case) 60s (in gas case)	>23300	Yes	0.12 nM (in solution case), 0.5 ppm/min (in gas case)	149

其中 2016 年 Yoon 教授及其研究團隊第一個發表了可區分光氣和神經毒劑類
 似物 (nerve-agent mimic) DCP (diethyl chlorophosphate) 的螢光比例探針 PY-OPD。
¹⁴³ 於 pyronins 螢光團上修飾 o-phenylenediamine (OPD) 基團，^{150,151} 而此基團上的一級
 胺會與光氣或 DCP 進行親核性取代反應 (醯基化或磷酸化)，分子結構上的轉
 變使得原本光誘導電子轉移 (photoinduced electron transfer, PET) 造成的螢光淬滅
 (quenching) 被抑制，導致螢光強度大幅度的增強 (turn-on) 放出綠色螢光。而此
 PY-OPD 感測分子與光氣反應進行醯基化後，會再進行分子內合環 (cyclization) 反
 應形成穩定的五元環結構 (benzimidazolone)，大大的改變了 pyronins 螢光團的螢
 光性質，meso 位由推電子的胺基轉變為拉電子的尿素基團，縮小 HOMO-LUMO
 之間的能階差，造成螢光放射波長紅移並放出紅色的螢光，如圖 1-2 所示，藉由不
 同的螢光放射可偵測並區分出光氣和 DCP。

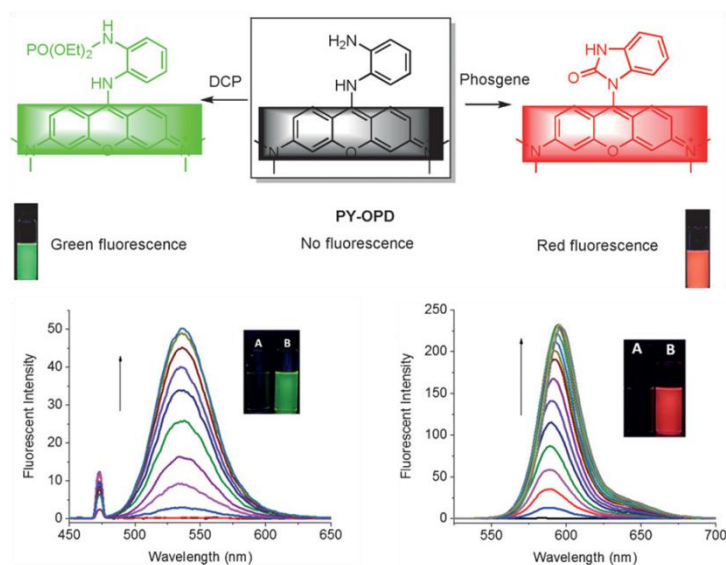


圖 1-2 上圖為 **PY-OPD** 螢光探針與光氣和 DCP 反應前後分子結構和螢光變化示
 意圖；下圖右為 **PY-OPD** 螢光探針 (10 μM 於氯仿) 逐漸加入三光氣 (0-2 equiv.)
 之螢光光譜圖， $\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$ ；下圖左為 **PY-OPD** 螢光探針 (10 μM 於氯仿) 逐漸加
 入 DCP (0-100 equiv.) 之螢光光譜圖， $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ (內插圖為加入光氣或 DCP 前後
 螢光顯色圖：A 為 **PY-OPD**，右 B 為 **PY-OPD-phosgene**，左 B 為 **PY-OPD-DCP**；
 箭頭代表隨著光氣或 DCP 濃度增加螢光強度的變化)。¹⁴³

2017年Tian教授及其研究團隊發表了以BODIPY螢光團為基礎的光氣螢光探針8-EDAB，¹⁴⁹不同於大部分探針以OPD為反應基團，其以8-EDAB以ethylenediamine (EDA) 為反應基團，但感測光氣的機制和前者類似，即和光氣進行兩次的加成離去反應，合環形成五圓環的2-imidazolidone結構，如圖1-3 (a) 所示。meso位推拉電子性的改變直接影響了BODIPY螢光團的螢光性質，從原本放出藍色螢光的8-EDAB轉變為放出綠色螢光的反應產物8-EDAB-phosgene，如圖1-3 (b) 所示。雖然在感測機制上並無新意，但此探針的靈敏度、反應速率和選擇性這三個方面可以說是所有代表性探針中最好的，且其偵測極限可至0.12 nM，也是至今所有光氣探針中唯一可以秒為單位檢測光氣濃度至亞奈莫耳 (subnanomolar) 的濃度，為快速檢測低濃度光氣提供實質的策略。

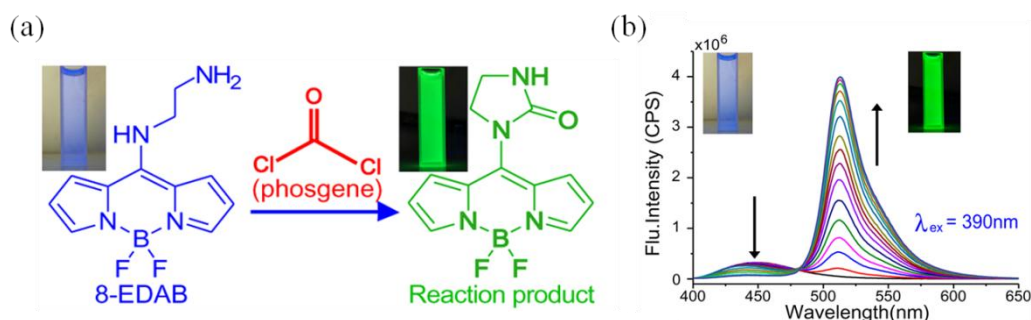


圖1-3 (a) **8-EDAB** 螢光探針與光氣應前後分子結構和螢光變化示意圖 (內插圖為加入光氣前後螢光顯色圖：左邊藍色螢光為 **8-EDAB**，右邊綠色螢光為 **8-EDAB-phosgene**)。 (b) **8-EDAB** 螢光探針 (10 μM 於乙腈) 逐漸加入三光氣 (0-0.6equiv.) 之螢光光譜圖，λ_{ex} = 390 nm (箭頭代表隨著光氣濃度增加螢光強度的變化)。¹⁴⁹



第二章 探針7-EDADBD之合成

2.1 研究動機與目的

由第一部分2.6.1章節中曾提及，在嘗試利用螢光團衍生物**7-EDADBD**上之胺基和三光氣 (phosgene) 反應產生含異氰酸酯 (isocyanate) 官能基的中間體，再和另一帶有胺基的分子反應來建立尿素官能基團同時連接兩個分子時，並沒有得到目標產物，反而意外發現了一高螢光產率之產物。由光譜分析後發現產物結構為benzofurazan7號位置上含有一五圓環，推測螢光團衍生物**7-EDADBD**和三光氣進行第一次加成離去反應形成一高活性中間體後，很快的會進行第二次分子內加成離去反應，進而合環得到產物，結構和反應式如圖2-1所示。而在反應過程中我們觀察到起始物和產物之螢光性質有很大的變化，這引發了我們的興趣，並思考此螢光團衍生物**7-EDADBD**作為一光氣探針之發展潛力。經一系列文獻搜尋後，發現至今為止報導過的光氣探針並沒有很多，且在靈敏度、反應速率和選擇性等方面均還有進步的空間，故我們將螢光團衍生物**7-EDADBD**作為一光氣螢光探針，並進行一系列的螢光性質測定，期望藉由觀察螢光性質的變化來達到光氣偵測的目的。

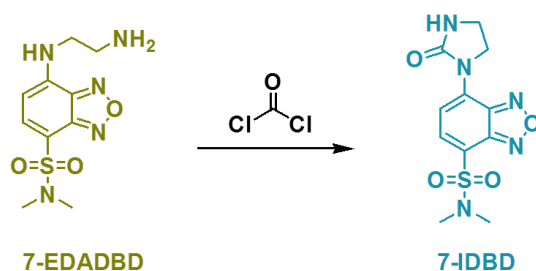
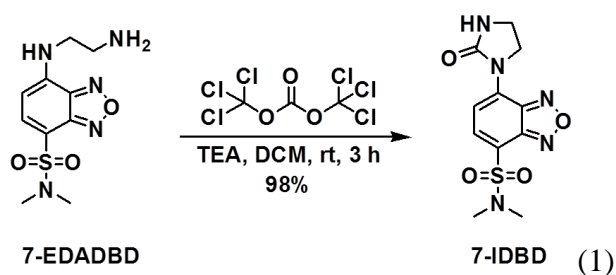


圖2-1 螢光團衍生物**7-EDADBD**和光氣反應之反應式。



2.2 探針7-EDADBD和產物7-IBBD之合成步驟

探針7-EDADBD之合成已於第一部分2.4.2章節介紹過了，因此只介紹產物7-IBBD的合成。7-IBBD由7-EDADBD與三光氣 (triphosgene)進行兩次加成離去反應而得。以二氯甲烷為溶劑，三乙胺 (TEA) 當作鹼中和反應過程中所產生的HCl，室溫下反應3小時後，經加壓管柱層析純化，可得目標產物7-IBBD，產率98%，如式 (1)。



第三章 實驗結果與討論



得到**7-EDADB**D和其**7-IBD**D後，先進行溶劑對於這兩個含有benzofurazan螢光衍生物的光物理性質變化之探討，接著選擇最優化的實驗溶劑，進一步探討**7-EDADB**D螢光探針對於光氣的反應時間、偵測極限與選擇性。

3.1 探針**7-EDADB**D和產物**7-IBD**D之溶劑效應

在第一部分1.5章節有提到以benzofurazan為骨架的螢光團為正溶劑化顯色 (positive solvatochromism)，即其吸收或放射波長會隨著溶劑極性增加而有紅移的現象，故將**7-EDADB**D和**7-IBD**D分別溶於不同極性的溶劑中，配置濃度為10 μM ，觀察這兩個benzofurazan衍生物的溶劑效應是否符合positive solvatochromism，並選擇較適合的溶劑進行之後的實驗。由於在不同溶劑中之螢光或吸收光譜波長變化不大，再加上強度不一，無法從光譜圖直接判斷最大波長是否隨溶劑極性之變化，故將光譜圖進行歸一化 (normalized) 後得到圖3-1 (a、b)。由圖3-1 (a、b) 吸收或放射光譜可清楚得知，不同溶劑的極性大小依序為DMSO > DMF > THF > Toluene > Cyclohexane，而不管是**7-EDADB**D還是**7-IBD**D，其吸收或放射光譜波長在這些溶劑中之大小依序為DMSO > DMF > THF > Toluene > Cyclohexane，均隨著溶劑極性增加而逐漸向長波長方向移動，證實這兩個benzofurazan衍生物均為positive solvatochromism。大部分溶劑化變色螢光團 (solvatochromic fluorophore) 其螢光量子產率會隨著溶劑極性增加而下降。由圖3-1 (c) 不同溶劑之螢光強度柱狀圖顯示，**7-EDADB**D在極性差異沒那大之低極性溶劑中 (THF、Toluene和Cyclohexane) 之螢光強度差不多，且大於在高極性溶劑 (DMF和DMSO)中之螢光強度，大致符合在高極性溶劑中螢光強度較低的趨勢。但**7-IBD**D在高極性溶劑中之螢光強度卻比部分低極性溶劑還來的高，推測其主要原因為7號位置上的官能基團改變了分子的推拉電子性，增加了分子在基態的偶極矩，基態和激發態的偶極矩差異變小，使得溶劑效應對於分子螢光強度的影響變小而沒有什麼規律可言，但不影響螢光波

長隨溶劑極性的變化。從圖3-1 (c) 還可以看出，**7-EDADBD**和**7-IDBD**在極性溶劑中螢光強度差較大，而在非極性溶劑中螢光強度差較小，故想選用一極性和一非極性溶劑來進行後續實驗的測定。原本打算用DMSO當作極性溶劑，但DMSO會和光氣反應，故選用螢光強度差異也很大之ACN溶劑代之。而考慮到**7-EDADBD**溶解度的因素，無法使用Cyclohexane作為低極性溶劑，故選擇相對極性較ACN低的DCM代之。

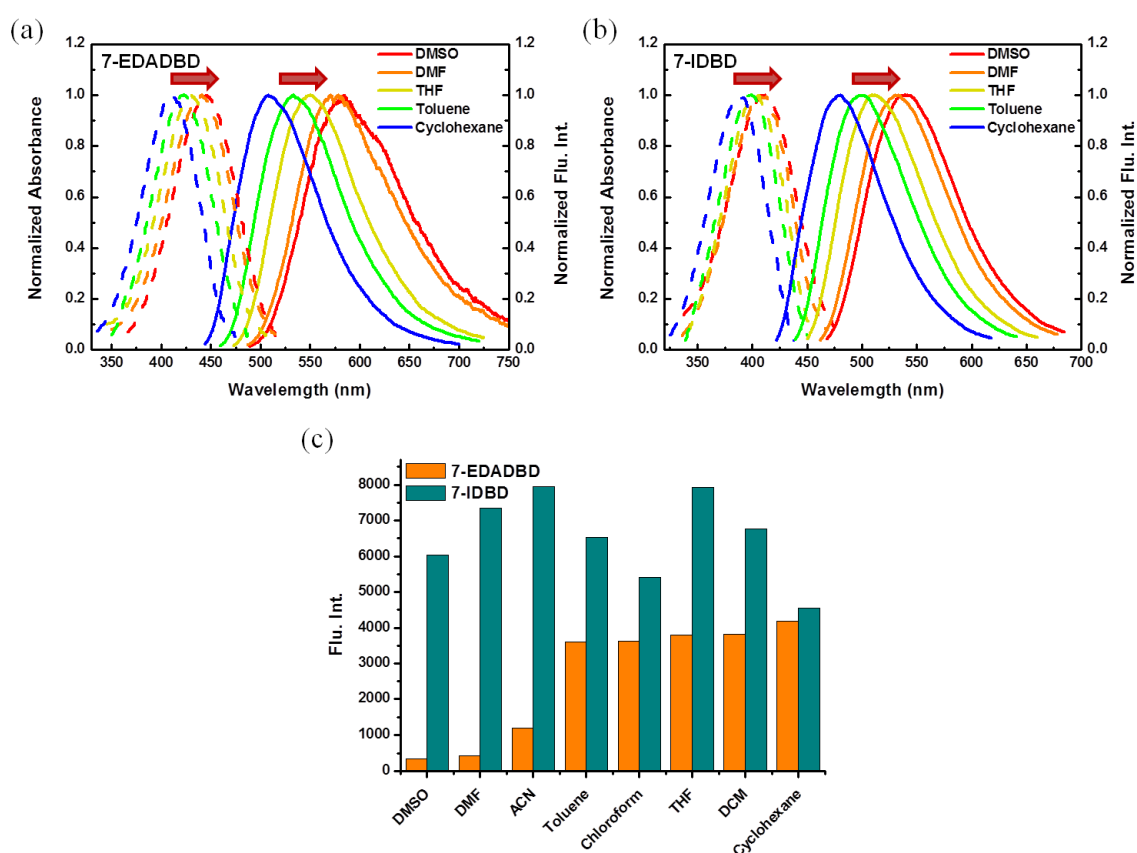


圖3-1 (a) **7-EDADBD**和 (b) **7-IDBD** (10 μ M) 在不同極性溶劑中之normalized吸收 (虛線) 和螢光 (實線) 光譜， $slit_{ex} / slit_{em} = 2.5 / 5$ nm (箭頭代表隨著溶劑極性增加螢光波長的變化)。(c) **7-EDADBD** (橄欖綠) 和**7-IDBD** (藏青色) 在不同溶劑之螢光柱狀圖。

3.2 探針**7-EDADBD**與產物**7-IDBD**之螢光性質和分子軌域能階

選擇完全適的溶劑後，先將**7-EDADBD**和**7-IDBD**分別溶於這兩個溶劑中進行

螢光性質的測定。在ACN溶劑中，**7-EDASBD**和**7-IBBD**之最大吸收波長分別為426、398 nm，而螢光最大放射波長分別為570、529 nm，螢光顏色分別為黃色偏綠（因為螢光強度較低，故顏色沒那麼明顯）和綠色，螢光強度差約6.5倍，如圖3-2 (a) 所示；在DCM溶劑中，**7-EDASBD**和**7-IBBD**之最大吸收波長分別為424、396 nm，而最大放射波長分別為549、507 nm，螢光顏色分別為黃色偏綠和綠色偏藍，螢光強度差約1.6倍，如圖3-2 (b) 所示。**7-EDASBD**和**7-IBBD**在這兩種溶劑中之最大吸收波長並沒有太大的差異，而最大放射波長則是在ACN溶劑中大於在DCM溶劑中，均差約22 nm。在高極性溶劑中溶劑效應較為顯著，故最大放射波長較在低極性溶劑中來的長。比較特別的是，不同於文獻報導的光氣探針，與光氣反應完得到的產物之光譜波長會比原本探針之光譜波長來得長，為一紅移現象，但本論文中**7-EDASBD**轉化為**7-IBBD**之光譜波長變化為藍移的現象。推測可能的原因為螢光團7號位置上之官能基從原本的推電子之胺基轉變為拉電子之尿素基團，給電子能力的下降使分子軌域能階差增加，進而造成**7-IBBD**之吸收或放射波長較短。

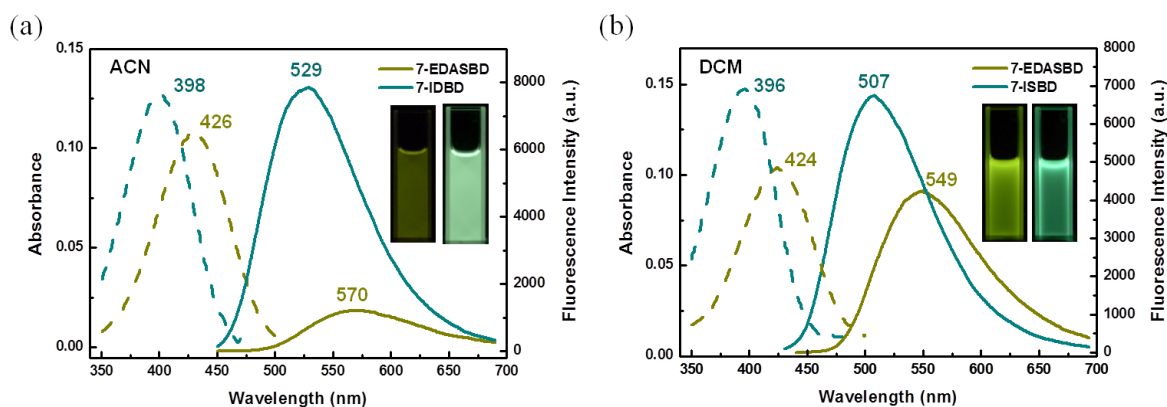



圖3-2 (a) **7-EDASBD**和**7-IBBD** (10 μM) 溶於ACN之吸收 (虛線) 和螢光 (實線) 光譜， $\lambda_{\text{ex}} = 426 \text{ nm}$ (**7-EDASBD**) & 398 nm (**7-IBBD**)。 (b) **7-EDASBD**和**7-IBBD** (10 μM) 溶於DCM之吸收 (虛線) 和螢光 (實線) 光譜， $\lambda_{\text{ex}} = 424 \text{ nm}$ (**7-EDASBD**) & 396 nm (**7-IBBD**)。 $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ (內插圖為**7-EDASBD** (左) 和**7-IBBD** (右) 之螢光顯色圖)。



為證實此推論，我們請中研院陳錦地教授實驗室之李怡葶學姊利用密度泛函理論 (density functional theory, DFT) 計算**7-EDADBBD**和**7-IDBD**之電子密度分佈和前緣分子軌域 (frontier orbitals) 能階，計算結果如圖3-3所示。Benzofurazan上4號位置之拉電子能力對於分子LUMO能階影響較大，而benzofurazan上7號位置之推電子能力對於分子HOMO能階影響較大，而**7-EDADBBD**和**7-IDBD**之拉電子基團均為磺醯亞胺 (sulfonimide)，故兩者之LUMO能階差異不大。但由電子密度分佈圖可知**7-IDBD**電子分佈較為離域 (delocalized)，如圖3-3右上所示，故LUMO能階較**7-EDADBBD**來得穩定一些。**7-EDADBBD**和**7-IDBD**上7號位置之基團分別為胺基和尿素基團，而尿素基團之拉電子特性會使**7-IDBD**電子分佈較為delocalized，如圖3-3右下所示，所以HOMO能階較**7-EDADBBD**來得穩定，但因電子特性轉變之大使兩者之HOMO能階差距較大，故縱使**7-IDBD**之LUMO能階亦低於**7-EDADBBD**，**7-IDBD**整體HOMO-LUMO能階差還是大於**7-EDADBBD**的。計算出的結果顯示**7-EDADBBD**和**7-IDBD**之HOMO至LUMO能階差分別為3.0813和3.2746 eV，換算為最大吸收波長則分別為402和378 nm。雖然**7-IDBD**和實際測得之最大吸收波長有些差距，但波長小於探針的趨勢是相同的。此理論計算驗證了**7-EDADBBD**轉化為**7-IDBD**之光譜波長變化為藍移的現象。

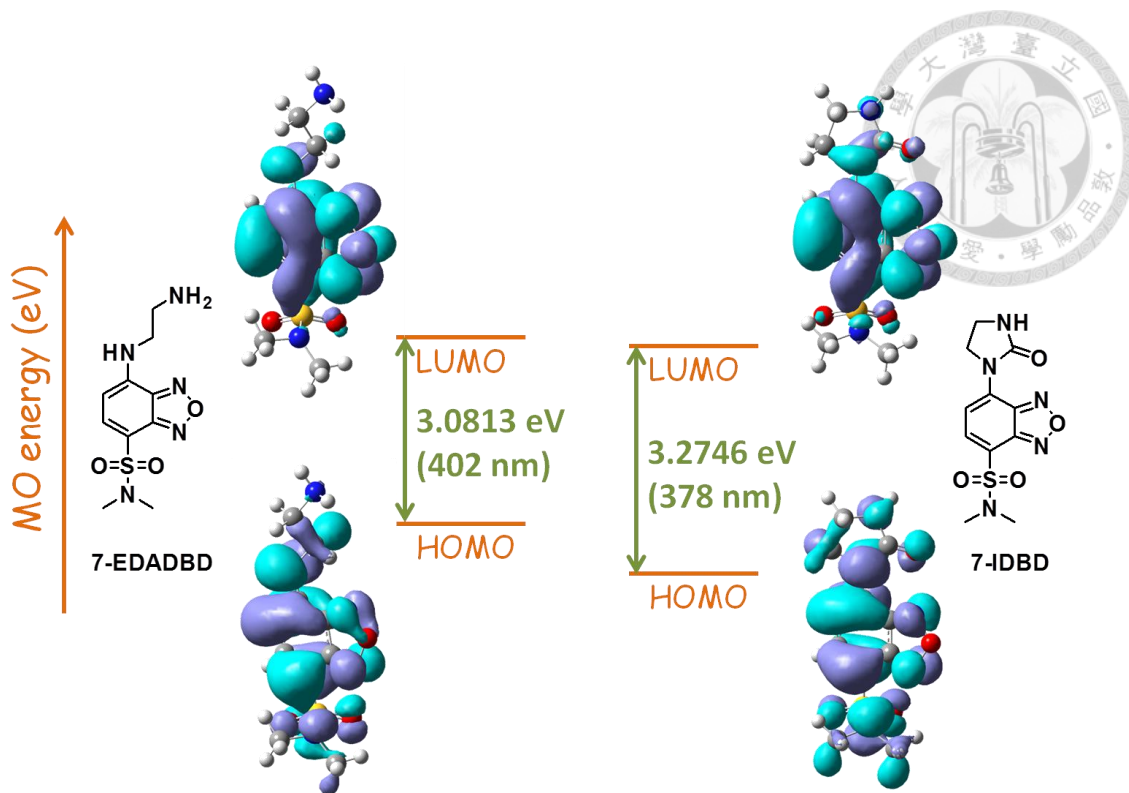


圖3-3 利用DFT理論計算**7-EDADB**和**7-IDBD**之電子密度分佈和前緣分子軌域能階分佈示意圖。

3.3 探針**7-EDADB**與光氣之反應時間與鹼滴定實驗

由第一章光氣介紹已知光氣是揮發性氣體且毒性高，而其前驅物 (precursor) 三光氣 (triphosgene) 毒性較小且為固體狀操作較容易，故常代替光氣製備尿素。因此本論文亦使用較為安全的三光氣取代光氣與探針**7-EDADB**進行反應。首先，探討**7-EDADB**與三光氣反應所需的時間，將其溶於ACN和DCM溶劑中，配製成 10 μM ，加入0.7當量三光氣進行時間過程 (time-course) 實驗。由圖3-4 (a、b) 可知，螢光強度隨時間增加而逐漸上升，但在DCM溶劑中上升幅度較為緩慢，波長則隨時間逐漸往短波長方向移動。取特定波長螢光強度和**7-IDBD**在該波長下之螢光強度比值對時間作圖可得圖3-4 (c)。由此圖可知在ACN溶劑中，**7-EDADB**與三光氣反應約在4小時後就差不多達平衡，最大轉換率約為78%；在DCM溶劑中，**7-EDADB**與三光氣反應看似在4小時達平衡，但將時間延長到21小時發現其比值還在持續上升中，且最大轉換率只有50%，代表探針尚未與三光氣反應完。



7-EDADBD如此長的反應時間是無法應用在快速檢測上的，故必須改善其反應速率的問題。

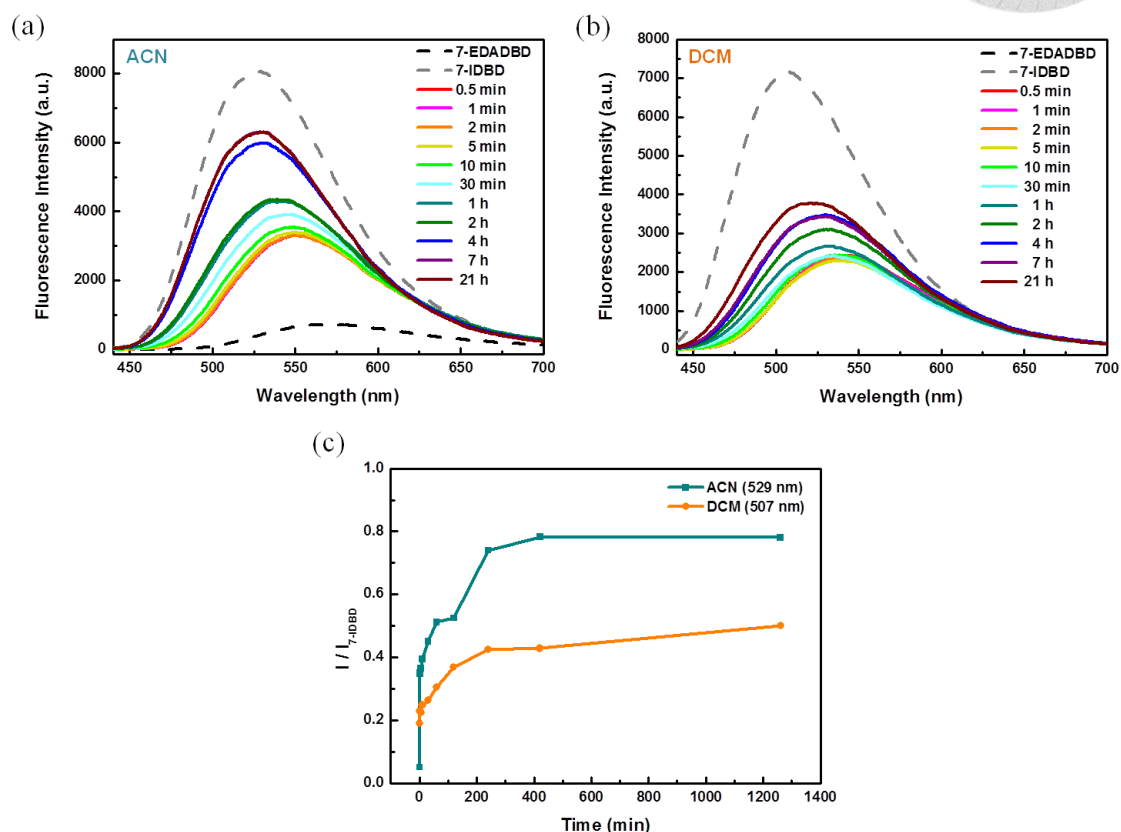


圖3-4 7-EDADBD (10 μ M) 在 (a) ACN和 (b) DCM溶劑中與三光氣 (0.7 equiv.) 反應之時間過程螢光光譜。(c) 特定波長 (ACN : 529 nm ; DCM : 507 nm) 之螢光強度和7-IDBD在該波長下之螢光強度比值對時間作圖。 λ_{ex} = 398 nm (ACN) & 396 nm (DCM), $slit_{ex} / slit_{em}$ = 2.5 / 5 nm。

有文獻報導指出在強親核體，例如氯離子 (chloride ion, Cl^-) 或三級胺 (tertiary amine) 存在下，會加速三光氣分解成活性較高的光氣，¹⁵²而三級胺也可當作鹼中和反應過程中產生的HCl，降低若7-EDADBD上胺基的質子化造成親核能力下降的情形，因此加入三乙胺 (triethylamine, TEA) 加快7-EDADBD和三光氣的反應速率。但TEA加入量的多寡會影響7-IDBD的螢光表現，故在進行7-EDADBD於TEA存在下與三光氣反應之時間過程實驗之前，須先進行TEA加入量優化的實驗，即

為鹼滴定實驗。將**7-EDADBD**溶於ACN和DCM溶劑中，配製成10 μM ，加入0.7當量三光氣，再加入不同濃度的TEA後進行螢光光譜的量測。取特定放射波長螢光強度對不同TEA濃度作圖可得圖3-5，由此圖可知在兩種溶劑中，當TEA濃度大於含有螢光強度最大值的濃度時，其螢光強度均隨TEA濃度的增加而逐漸下降。在ACN和DCM溶劑中，螢光強度最大值分別發生在TEA濃度為0.1 μM 和1 μM 時，故分別選用這兩個濃度作為後續實驗中TEA加入量的參考依據。此實驗中意外發現在ACN溶劑中使用的TEA量小於在DCM溶劑中，推測可能在ACN溶劑中，**7-EDADBD**和三光氣反應較快，故較少TEA量就能催化反應完全而達到螢光強度最大值。

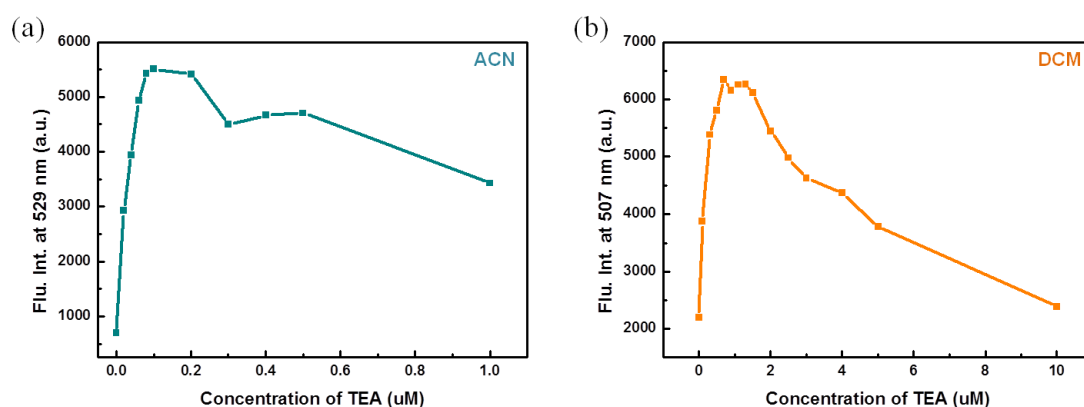


圖3-5 **7-EDADBD** (10 μM) 在ACN (a) 和DCM (b) 溶劑中於不同濃度TEA存在下與0.7當量三光氣反應之特定放射波長 (ACN: 529 nm; DCM: 507 nm) 螢光強度對不同TEA濃度作圖。 $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}$ (ACN) & 396 nm (DCM), $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ 。

得到最優化TEA加入量條件後，接著進行探針**7-EDADBD**於TEA存在下與三光氣反應之時間過程實驗。將探針分別溶於ACN和DCM溶劑並分別加入0.1 μM 和1 μM TEA，最後加入0.7當量三光氣後於不同時間點進行螢光光譜的量測，可得圖3-6 (a、b)。由此圖可知，和未加入TEA之時間過程實驗相比，純**7-EDADBD**在加入三光氣30秒後螢光強度變化更為明顯。取特定波長螢光強度和**7-IDBD**在該波長

下之螢光強度比值對時間作圖可得圖3-6 (c)，由此圖可知在ACN溶劑中，**7-EDADBD**與三光氣反應約在5分鐘後達平衡，最大轉換率約為84%。在DCM溶劑中，**7-EDADBD**與三光氣反應約在2分鐘後達平衡，最大轉換率約為64%。在後續滴定、選擇性等實驗中分別選用這兩個時間作為反應時間的參考依據。

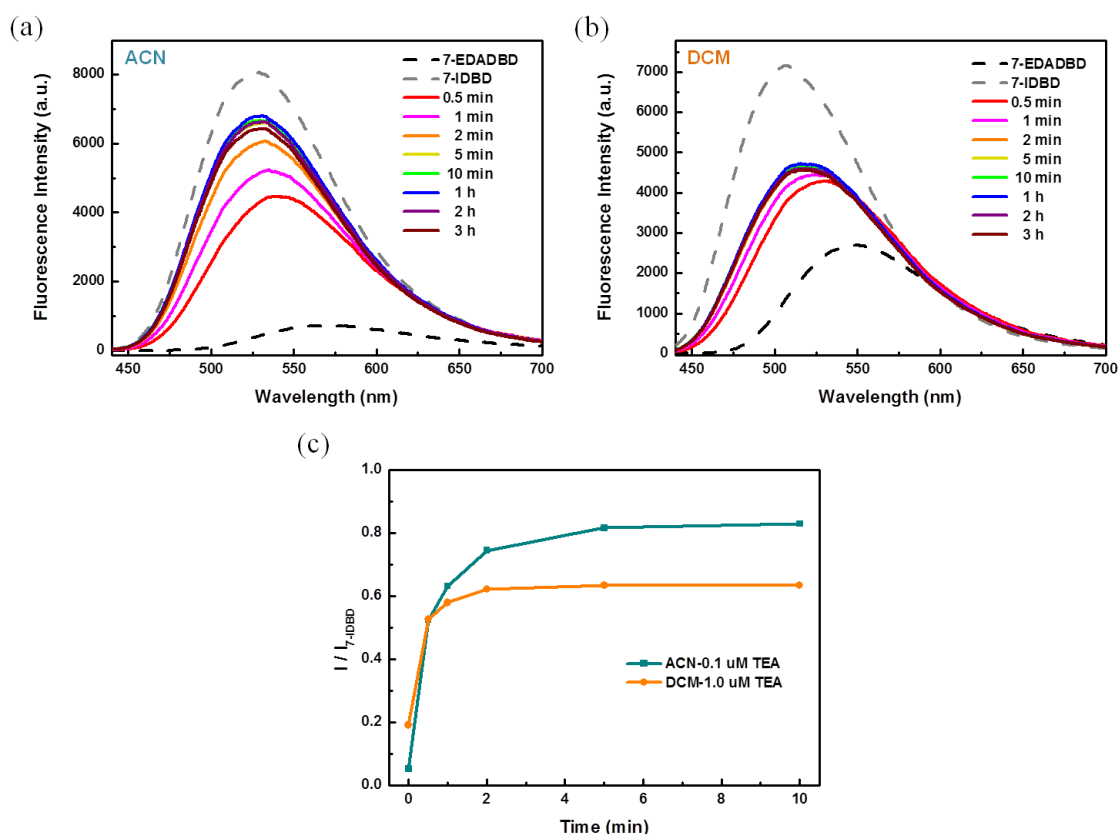


圖3-6 (a) **7-EDADBD** (10 μM) 溶於ACN中，在TEA (0.1 μM) 存在下和三光氣 (0.7 equiv.) 反應之時間過程螢光光譜。(b) **7-EDADBD** (10 μM) 溶於DCM中，在TEA (1 μM) 存在下和三光氣 (0.7 equiv.) 反應之時間過程螢光光譜。(c) 特定波長 (ACN : 529 nm ; DCM : 507 nm) 之螢光強度和**7-IDBD**在該波長下之螢光強度比值對時間作圖。 $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}$ (ACN) & 396 nm (DCM), $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ 。

將探針**7-EDADBD**在不同溶劑和TEA濃度下和三光氣反應之平衡時間和轉換率整理於表3-1。若比較有無加入TEA之差異，不管是在ACN還是DCM溶劑中，加入TEA均大大提升**7-EDADBD**和三光氣的反應速率，從原本的4小時和大於21小時

分別縮短為5分鐘和2分鐘。最大轉換率也略為提升，從78%和50%分別變為84%和64%。若比較同一溶劑加入不同濃度TEA之差異，加入較高濃度TEA會使反應速率較快，但會大大降低轉換率，如在DCM溶劑中，加入1 μM 的TEA使反應在2分鐘內就達平衡，但轉換率只有64%，而加入0.1 μM 的TEA雖然使反應在30分鐘後才達平衡，但轉換率卻可高達92%，如何在反應速率和轉換率之間取得一平衡點也是值得探討的。若比較不同溶劑中達平衡時間之差異，不管TEA加入與否，在DCM溶劑中達平衡時間均比在ACN溶劑中長，反映**7-EDADB**在高極性溶劑中與三光氣反應速率較快，推測可能反應過程中有極性中間體 (intermediate) 產生，極性溶劑可以穩定此中間體，進而加快反應速率。

表3-1 探針**7-EDADB**在不同溶劑和TEA濃度下和三光氣反應之平衡時間和轉換率整理表。

	TEA	Balance time	Conversion
ACN	0 μM	4 h	78%
	0.1 μM	5 min	84%
	1 μM	0.5 min	54%
DCM	0 μM	>21 h	50%
	0.1 μM	30 min	92%
	1 μM	2 min	64%

3.4 探針**7-EDADB**對光氣之滴定實驗與偵測極限

接著進行三光氣與探針**7-EDADB**的滴定實驗，將**7-EDADB**溶於ACN和DCM溶劑中，配製成10 μM ，在TEA存在下加入不同當量三光氣後進行螢光光譜的量測，可得圖3-7 (a、b)，由此圖可知，不管是在ACN還是DCM溶劑中，由於**7-EDADB**和**7-IDB**的最大放射峰之波長相差不大 (差約40 nm)，故無法藉由兩峰螢光強度之消長來觀察**7-EDADB**和三光氣的反應程度，只看出隨著三光氣當

量數增加，最大放射波長逐漸往**7-IDBD**的最大放射波長移動，其中又以在DCM溶劑中較為明顯，因為**7-EDADB**D和**7-IDBD**的螢光強度在DCM溶劑中差異不大，故會放大波長的移動，且於537 nm波長處有一明顯消光點 (isosbestic point)。而在ACN溶劑中，**7-EDADB**D和**7-IDBD**的螢光強度差異較大，故相對於波長的變化，螢光強度隨三光氣之當量數增加而逐漸上升的變化更為明顯，且在當量數大於1時，其螢光強度則逐漸下降，代表過多三光氣也會影響螢光的表現。取特定波長 (ACN : 529 nm ; DCM : 507 nm) 之螢光強度對不同三光氣當量數作圖可得圖3-7 (c、d)。由此圖可知當加入大於0.7當量三光氣，螢光強度均沒有太大的變化，即在這兩種溶劑中，三光氣飽和當量數均為0.7當量，而在此當量數下轉換率分別為93% (ACN) 和80% (DCM)。

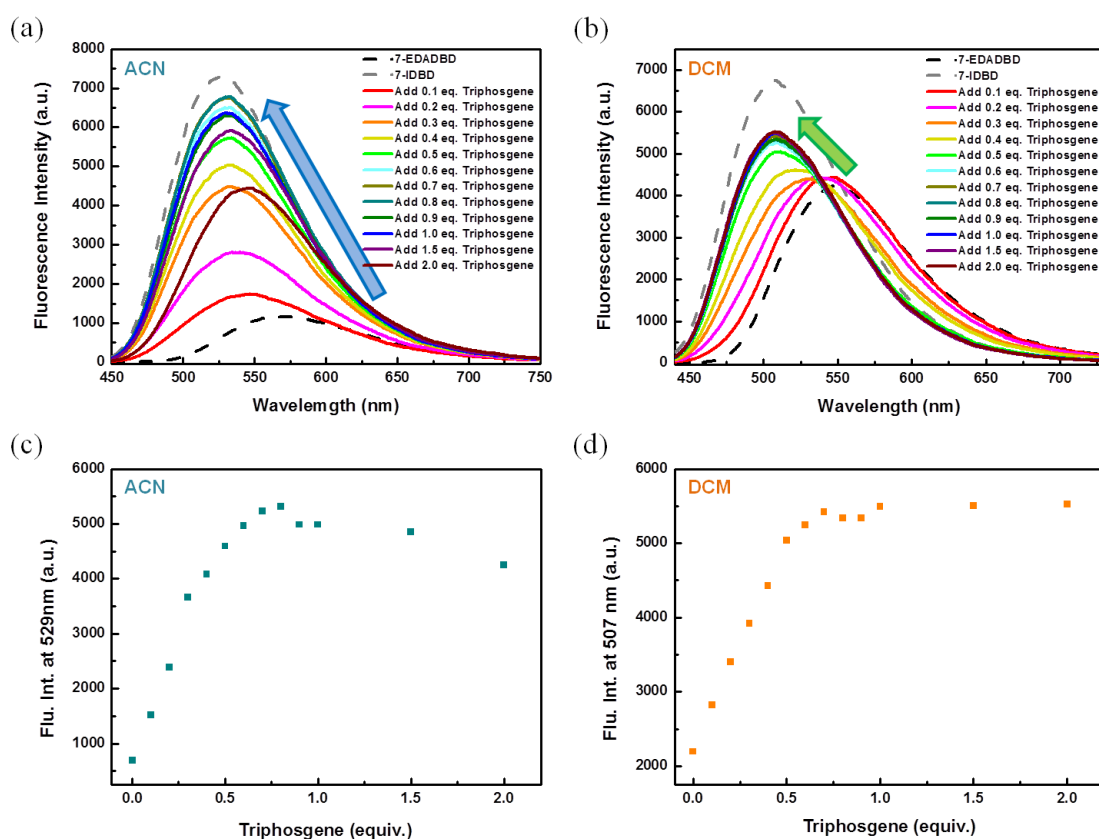


圖3-7 **7-EDADB**D (10 μ M) 於 (a) ACN和 (b) DCM溶劑中在TEA存在下 (ACN : 0.1 μ M ; DCM : 1 μ M) 加入不同當量的三光氣 (0-2 equiv.) 進行滴定實驗之螢光光譜。 λ_{ex} = 421 nm (ACN) & 413 nm (DCM), $slit_{ex} / slit_{em}$ = 2.5 / 5 nm (箭頭代表隨三



光氣濃度增加螢光強度的變化)。(c) ACN和 (d) DCM溶劑中特定波長 (ACN：529 nm；DCM：507 nm) 之螢光強度對不同三光氣當量數作圖。

利用滴定實驗結果計算探針**7-EDADB**D對於三光氣的偵測極限，計算方式則參考先前文獻報導的方法，¹⁵³取滴定實驗中具有線性的幾個點，以三光氣濃度為X軸，不同濃度下特定波長 (ACN：529 nm；DCM：507 nm) 之螢光強度為Y軸作圖，可得一檢量線 (calibration curve)，如圖3-8所示。接著再由此檢量線以直線迴歸方法計算出之斜率 (slope, m) 和儀器測量之訊號不準度，套入 $3\sigma/m$ 之公式計算出**7-EDADB**D對於三光氣的偵測極限，而其中儀器測量之訊號不準度，是指純**7-EDADB**D使用相同螢光儀重複10次進行螢光光譜的空白量測，經計算後得到一標準差 (standard deviation, σ)。在ACN和DCM溶劑中，檢量線斜率分別為737.5107和521 μM ，而標準差則分別為2.999896和8.383025，最後計算出之偵測極限分別為12.2和48.3 nM。雖然在DCM溶劑中測得的偵測極限略大於在ACN溶劑中測得的，但兩者均在奈米莫耳濃度等級，遠低於光氣會對人體造成刺激或致死之濃度，因此**7-EDADB**D能有效的偵測環境中之低濃度光氣，進而降低人體暴露於光氣之機率。

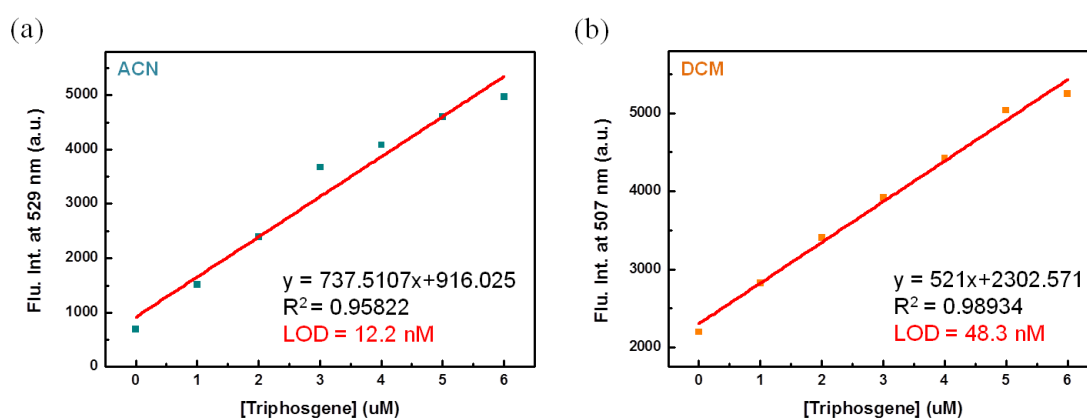


圖3-8 **7-EDADB** (10 μM) 在 (a) ACN和 (b) DCM溶劑中特定波長 (ACN：529 nm；DCM：507 nm) 之螢光強度對不同三光氣濃度 (0-6 μM) 作圖。 $\lambda_{\text{ex}} = 398$ nm (ACN) & 396 nm (DCM)， $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5$ nm。



3.5 探針7-EDADBD與三光氣之反應機制和選擇性實驗

參考文獻推測探針**7-EDADBD**和三光氣之反應機制應如圖3-9所示。**7-EDADBD**上之一級胺先和三光氣進行第一次的加成-離去反應，脫去一分子光氣和鹽酸後，形成一高活性的中間產物，而此活性中間體會促使第二次加成離去反應的進行，使分子合環形成**7-IDBD**。反應中產生的光氣副產物為活性比三光氣還高的物質，因此其亦會與探針反應，這也是為什麼只需要加入0.7當量的三光氣滴定曲線即達飽和。

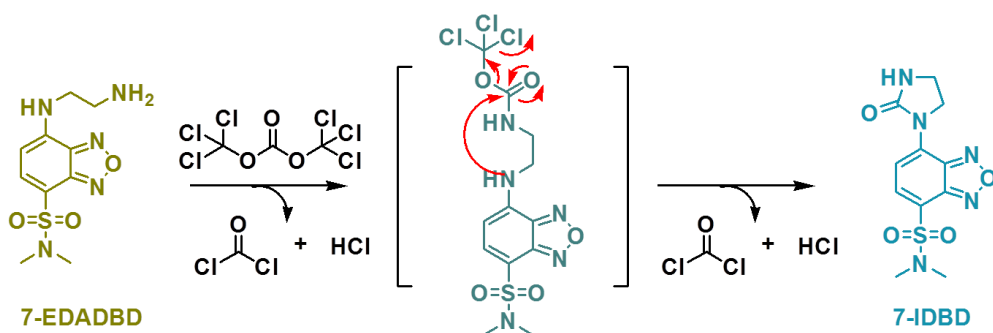



圖3-9 探針**7-EDADBD**與三光氣反應機制示意圖。

由於探針上之一級胺有很好的親核性，有可能與其他親電試劑反應而影響和光氣的反應性。故評估探針**7-EDADBD**對三光氣的辨識特異性，將其對其他類似反應性之有毒化學物質（作為干擾物質的模擬），例如醯氯（acyl chlorides）和磷酸酯（organophosphate，OP）神經代謝模擬物等活性物質進行選擇性的測試。將**7-EDADBD**溶於ACN和DCM溶劑中，配製成10 μM，加入不同活性物質（20 equiv.），包含乙酸酐（acetic anhydride，AA）、氯乙醯氯（chloroacetyl chloride，CAC）、乙醯氯（acetyl chloride，AC）、乙二醯氯（oxalyl chloride，OC）、氯化亞砷（thionyl chloride，TC）、氯磷酸二乙酯（diethyl chlorophosphate，DCP）、二氯硫化碳（thiophosgene，TP）、硫醯氯（sulfuryl chloride，SC）、三氯氧磷（phosphorus oxychloride，POC），結構如圖3-10 (a) 所示，進行螢光光譜的量測後，可得圖3-10 (b、c)。取特定波長（ACN：529 nm；DCM：507 nm）之螢光強度作成柱狀圖方便比較，如圖3-10 (d) 所



示。由這三個圖可知，同一活性物質在兩種溶劑中之螢光變化趨勢大致相同，**7-EDADB**D和三光氣反應之螢光強度變化最為明顯，螢光增強分別可達15.6 (ACN) 和5.3 (DCM) 倍。部分活性物質和**7-EDADB**D反應完後螢光強度會略微上升或下降，如AA、CAC、AC、DCP等，在ACN和DCM溶劑中之螢光增強倍率分別為3.4-6.7倍和1.2-2.1倍，均遠低於和三光氣反應之螢光增強倍率。有些活性化合物會造成螢光淬滅，如OC、TC、TP、SC。造成螢光強度略為改變之原因，推測為這幾個活性分子和探針進行完第一次加成離去反應後所形成的中間體不具有離去基，故無法再進行分子內的加成離去環化反應，只在一級胺上進行反應並不會影響螢光團，但可能會因為其他因素使螢光強度發生改變。而造成螢光淬滅原因則是反應所產生的中間體具高活性，故會使分子合環形成不具螢光之產物，但也有可能是因為活性物質破壞了整個螢光團之結構，造成螢光淬滅。縱使這些活性物質均會和探針反應，但和三光氣反應之螢光強度變化最為明顯，故可用螢光強度高低來區別三光氣和其他活性物質。

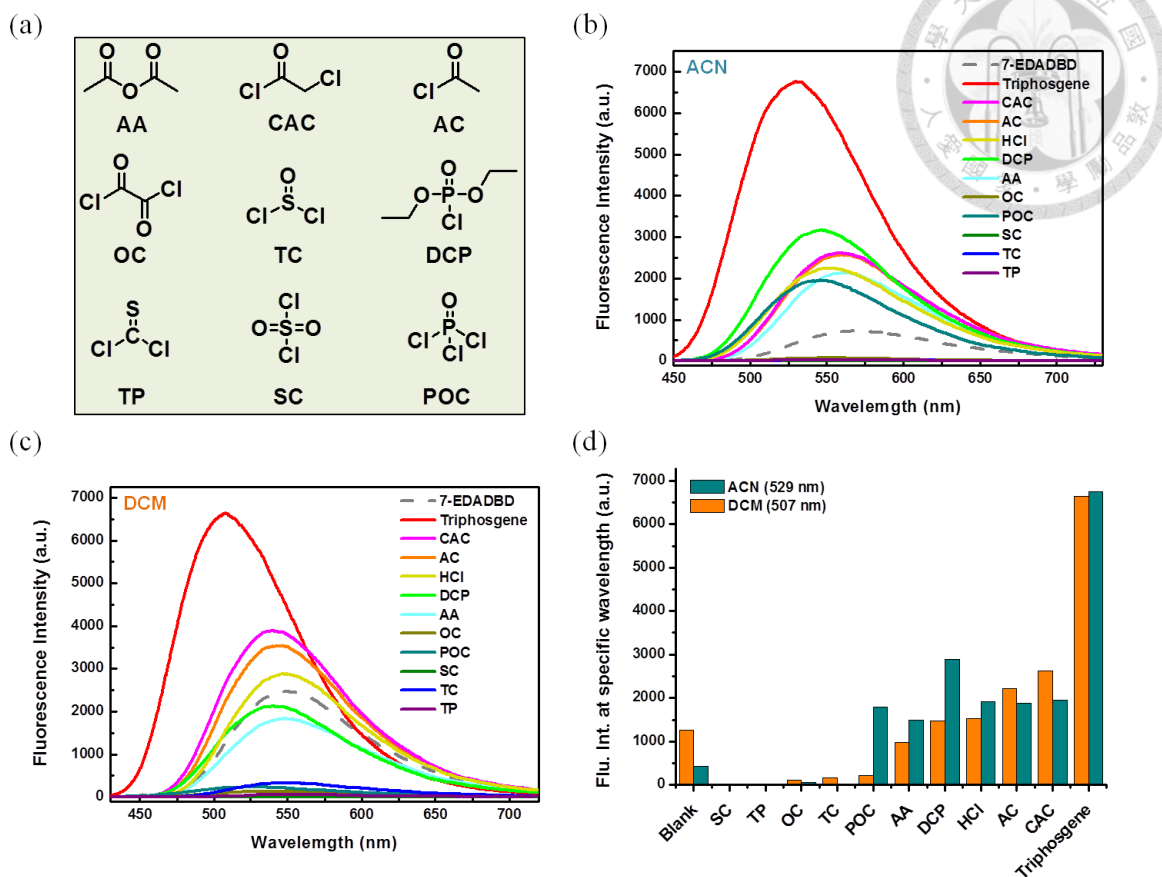


圖3-10 (a) 不同活性物質之分子結構。7-EDADBD (10 μM) 於 (b) ACN和 (c) DCM溶劑中與三光氣 (0.7 equiv.) 和不同活性物質 (20 equiv.) 進行選擇性實驗之螢光光譜。 $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}$ (ACN) & 396 nm (DCM), $\text{slit}_{\text{ex}} / \text{slit}_{\text{em}} = 2.5 / 5 \text{ nm}$ 。(d) 特定波長 (ACN : 529 nm ; DCM : 507 nm) 之螢光強度柱狀圖。

第四章 總結



此研究成功合成了以benzofurazan為骨架、一級胺為反應位點的光氣螢光探針**7-EDADBD**，並探討其在不同極性溶劑中與光氣反應之反應速率、螢光性質、偵測極限、選擇性等，相關實驗數據整理於表4-1。在溶劑效應實驗中驗證**7-EDADBD**為positive solvatochromism；在時間過程實驗中發現探針**7-EDADBD**在高極性溶劑中之反應速率大於在低極性溶劑中，在TEA存在下，於ACN和DCM溶劑中與三光氣反應時間分別為5和2分鐘，兩者均小於5分鐘，故能快速偵測光氣為此探針之一大特點；在滴定實驗中，三光氣飽和當量數在這兩種溶劑中均為0.7當量，而在此當量數下轉換率分別為93% (ACN) 和80% (DCM)。此外，由滴定實驗所得之**7-EDADBD**對於三光氣之偵測極限分別為12.2 (ACN) 和48.3 nM (DCM)，兩者均在奈米莫耳濃度等級，遠低於光氣會對人體造成刺激或致死之濃度，因此**7-EDADBD**能有效的偵測環境中之低濃度光氣，進而降低人體暴露於光氣之機率。最後在選擇性實驗中，雖然許多活性物質均會和**7-EDADBD**反應，但和三光氣反應之螢光強度變化最為明顯，螢光增強分別可達15.6 (ACN) 和5.3 (DCM) 倍，故可用螢光強度高低來區別三光氣和其他活性物質。所有性質中最特別的是，不同於文獻報導過的光氣探針，其與光氣反應完得到的產物之光譜波長會比原本探針之光譜波長來得長，為一紅移現象，但本論文中探針**7-EDADBD**轉化為產物**7-IDBD**之光譜波長變化為藍移的現象，而此現象已由DFT理論計算得到驗證。

表4-1 探針**7-EDADBD**相關實驗數據整理表。

	Reaction time	Saturation equiv.	Conversion	LOD	Flu. Int. enhancement
ACN	5 min	0.7 equiv.	93%	12.2 nM	15.6 times
DCM	2 min	0.7 equiv.	80%	48.3 nM	5.3 times

實驗部分



一、一般敘述

1. 測試及實驗儀器

(1) 核磁共振光譜 (Nuclear Magnetic Resonance Spectrum, NMR)：氫核磁共振光譜 ^1H NMR (400 MHz) 和碳核磁共振光譜 ^{13}C NMR (100 MHz) 之測定是使用 Bruker AVIII 400MHz 光譜儀測定。測定溶劑為氘氣仿 (CDCl_3)、氘甲醇 (CD_3OD)、氘二甲基亞砜 ($\text{DMSO-}d_6$) 氘丙酮 ($\text{acetone-}d_6$)、或氘二氯甲烷 (CD_2Cl_2)，化學位移以 ppm 為單位，以溶劑峰或四甲基矽烷 ($\delta = 0$) 為基準，氘氣仿 = 7.24、氘甲醇 = 3.31、氘代二甲基亞砜 = 2.50、氘丙酮 = 2.05、氘二氯甲烷 = 5.32。 ^1H NMR 分裂定義如下：單峰 (singlet, s)；雙峰 (doublet, d)；三重峰 (triplet, t)；四重峰 (quartet, q)；多重峰 (multiplet, m)；寬峰 (br)。偶合常數以 J 表示，單位是 Hz。


(2) 電噴灑高解析度質譜儀 (Electrospray-Ionization High-Resolution Mass, ESI-HRMS)：委託系上職員進行樣品測定，使用儀器為 Waters LCT Premier XE Q-TOF 質譜儀串連 Waters Alliance[®] 2695 HPLC 高效能液相層析系統。

(3) 紅外線光譜 (Infrared Spectrum, IR)：使用 Thermo Scientific Nicolet Is4 光譜儀測定，樣品製成以純液 (neat)、二氯甲烷或甲醇溶液 (soln.) 滴至硒化鋅 (ZnSe) 鹽片上，待溶液揮發後進行測定，光譜單位為波數 (cm^{-1})。

(4) 薄層色層分析 (Thin Layer Chromatography, TLC)：使用 Merck silica gel 60 F₂₅₄ 層析薄片。以有機溶劑展層後，利用手持紫外燈檢視，或使用磷鉬酸 (Phosphomolybdic acid, PMA)、茚三酮 (Ninhydrin) 等顯色劑浸染後燒片顯色。

(5) 加壓管柱色層分析 (Flash Column Chromatography)：管柱以 silica gel 60 型 (230-400 mesh ASTM) 或 MB 70-40/75 (Chromatorex) 矽膠填充於玻璃管柱，壓力來源為市售水族箱用氣體幫浦。

(6) 紫外/可見光光譜 (Ultraviolet/Visible Spectrum, UV/Vis)：使用 Hewlett-Packard (HP) 8453 型儀器測定。

- 
- (7) 螢光光譜 (Fluorescence Spectrum)：使用 Hitachi F-4500 型儀器測定。其內部光電倍增管是使用 Hamamatsu R928 Photomultiplier tube。
- (8) 動態光散射 (Dynamic Light Scattering, DLS)：將樣配製成特定濃度後，加入表面電位專用的 cell 中，以 Malvern Zetasizer Nano Particle Analyzer ZS 型表面電位儀來進行量測。
- (9) 穿透式電子顯微鏡圖像：使用 Hitachi H-7650 或 Hitachi H-7100 電子顯微鏡測定。
- (10) 熔點測定 (Melting point, mp)：使用 Meltemp 熔點測定器測定。
- (11) 雷射掃描式共軛焦電子顯微鏡圖像：使用 Leica TCS SP8 X Spectral Confocal 儀器測定。

2. 溶劑之前處理

- (1) 無水四氫呋喃 (Tetrahydrofuran, THF) 使用 Merck 試藥級溶劑，經金屬鈉乾燥，於二苯基酮 (benzophenone) 呈深藍色狀態下，蒸餾使用。
- (2) 無水二氯甲烷 (Dichloromethane, CH_2Cl_2) 使用 Seedchem 工業級溶劑，經氫化鈣乾燥蒸餾使用。

3. HF-7 α -Gly-EDIOL、HF-7 α -U-EDIOL、DBD-7 α -Gly-EDIOL、DBD-7 α -U-EDIOL

於不同體積比例 DMSO/ H_2O 混合溶液之樣品製備

- (1) 紫外光-可見光吸收度及螢光測量之樣品製備：

以 20% DMSO 水溶液為例，將樣品溶於 DMSO 中配置成 1×10^{-3} M 母溶液 (stock solution)，由於 DMSO 和 H_2O 混合時，會放出熱並產生微小氣泡，於是先將 570 μL DMSO 和 2400 μL H_2O 均勻混合，靜置 10 分鐘待溫度下降和氣泡消失後，再加入 30 μL 母液，均勻混合後可配置為溶液總濃度為 1×10^{-5} M，體積為 3 mL，同理可配置出不同體積比例 DMSO 與 H_2O 混合溶液。由於分子組裝需要時間，故靜置 2 小時後再進行測量。



(2) 動態光散射與表面電位量測之樣品製備

以 5% DMSO 水溶液為例，將樣品溶於 DMSO 中配置成 4×10^{-3} M 母溶液，將 100 μ L 母溶液加入 1900 μ L H_2O 水溶液均勻混合後，可配置為溶液總濃度為 2×10^{-4} M，體積為 2 mL，同理可配置出不同體積比例 DMSO 與 H_2O 混合溶液。由於 DMSO 和 H_2O 混合時，會放出熱並產生微小氣泡，於是靜置 5 分鐘待溫度下降和氣泡消失後才進行量測。

(3) 穿透式電子顯微鏡之樣品製備

樣品溶液配置同動態光散射與表面電位量測之樣品製備，將樣品以 vortex 均勻混合後，取 10 μ L 滴於銅網上，沉降 30 秒後以濾紙吸去溶液，水洗 1 次後以濾紙吸去水，等 30 分鐘待樣品乾燥後，不染色直接進行觀測。或以 10 μ L、2% UA (醋酸鈾鹽) 負染色 30 秒後以濾紙吸去染料，水洗 1 次後以濾紙吸去水，等 30 分鐘待樣品乾燥後，接著進行觀測。

4. 探針 7-EDADBBD 測試與實驗方法

(1) 溶劑效應實驗

將化合物 7-EDADBBD、7-IDBD 溶於光譜級二氯甲烷，配置成 1×10^{-2} M 之母液，再稀釋成 1×10^{-3} M 之子液，取 30 μ L 子液加入 2970 μ L ACN、 CH_2Cl_2 、DMSO、DMF、THF、toluene、cyclohexane 等不同溶劑中，配置成體積 3 mL、濃度為 10 μ M，先進行吸收光譜的測定，再以化合物最大吸收峰之波長進行螢光光譜的測定。

(2) 時間過程實驗

將化合物 7-EDADBBD 溶於光譜級二氯甲烷，配置成 1×10^{-2} M 之母液，再稀釋成 1×10^{-3} M 之子液，取 30 μ L 子液加入 2949、2946、2919 μ L ACN 或 CH_2Cl_2 溶劑中，再加入 0、3、30 μ L 之 1×10^{-4} M 三乙胺 (溶劑為 CH_2Cl_2)，最後加入 21 μ L 之 1×10^{-3} M 三光氣 (溶劑為 CH_2Cl_2)，每隔一段時間進行螢光光譜的測定。

(3) 滴定實驗

將化合物 7-EDADBBD 溶於光譜級二氯甲烷，配置成 1×10^{-2} M 之母液，再稀

釋成 1×10^{-3} M 之子液，依下表加入 1×10^{-4} M TEA、 1×10^{-3} M 三光氣、 1×10^{-3} M 化合物 **7-EDADBD** 子液和溶劑，均勻混合等 2 分鐘後，進行螢光光譜的測定。

三光 氣當 量數	7-EDADBD 加入量 (μ L)	三光氣 加入量 (μ L)	ACN		DCM	
			TEA 加入 量 (μ L)	溶劑加入 量 (μ L)	TEA 加入 量 (μ L)	溶劑加入 量 (μ L)
0.1	30	3	3	2964	30	2937
0.2	30	6	3	2961	30	2934
0.3	30	9	3	2958	30	2931
0.4	30	12	3	2955	30	2928
0.5	30	15	3	2952	30	2925
0.6	30	18	3	2949	30	2922
0.7	30	21	3	2946	30	2919
0.8	30	24	3	2943	30	2916
0.9	30	27	3	2940	30	2913
1.0	30	30	3	2937	30	2910
1.5	30	45	3	2922	30	2895
2.0	30	60	3	2907	30	2880

(4) 選擇性實驗

將化合物 **7-EDADBD** 溶於光譜級二氯甲烷，配置成 1×10^{-2} M 之母液，再稀釋成 1×10^{-3} M 之子液，取 30 μ L 子液加入 ACN 或 CH_2Cl_2 溶劑中，分別再加入 10 當量待測分析物，配置成體積 3 mL、濃度為 10 μ M，均勻混合等 2 分鐘後，進行螢光光譜的測定。



二、生物活性測試方法

1. 細胞株

使用 MCF-7 乳癌細胞株 (human breast adenocarcinoma)，組織來源為癌症之乳房、乳腺之上皮細胞，可由轉移區域之胸腔積液中分離而得。主要型態為黏附型 (adherent)，約 29 小時分裂一次，其表型為 estrogen receptor positive，需生長在 37 °C 和 5% CO₂ 之培養箱中。

2. 細胞培養與實驗需要使用之試劑

- (1) DMEM 培養基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (1X, liquid): 購自 GIBCO，其中含有高葡萄糖、L-Glutamine、phenol red。
- (2) 胎牛血清 (Fetal bovine serum; FBS): 由牟中原實驗室配置。
- (3) Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin, 1 mM EDTA ·4Na): 由牟中原實驗室配置。
- (4) Trypan blue solution (0.4%): 由牟中原實驗室購買。
- (5) PBS solution: 由牟中原實驗室配置。
- (6) 玻片封片劑: Molecular probes (ProLong[®] Gold antifade reagent)，購自 Life Technologies Corporation。
- (7) 細胞冷凍劑: Cell Freezing Medium-DMSO，由牟中原實驗室購買。

3. 細胞培養之使用器材

- (1) 無菌操作台 (laminar flow hood)
- (2) 二氧化碳培養箱 (CO₂ incubator)
- (3) 培養皿 (10 cm dish、75 cm² flask)、細胞培養盤 (12、24 孔盤)
- (4) 自動吸管 (autopipet)
- (5) 微量吸管 (micropipet)
- (6) 滅菌滴管 (1, 5, 10, 25 mL)
- (7) 細胞冷凍管 (1 mL)

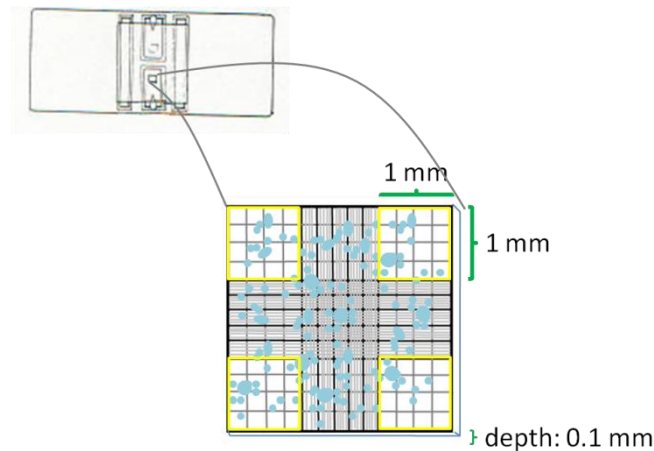


- (8) 倒立式顯微鏡
- (9) 血清計數器 (hemocytometer)
- (10) 倒立式螢光顯微鏡：OLYMPUS IX71S1F-3 型號

4. 細胞培養實驗

- (1) 取出保存於液氮桶中的 MCF-7 細胞株冷凍小管，遵循慢凍快解的原則，於 37 °C 水浴槽中快速解凍，此時要避免將管口浸入水面而造成汙染。
- (2) 在 10 cm 培養皿加入 8 mL 含有 10% FBS 之細胞培養基 (DMEM)，將解凍之細胞均勻地灑入培養皿中，並以倒立顯微鏡觀察懸浮之細胞均勻與否。
- (3) 該細胞在解凍後約 3-5 小時將貼附於培養皿中，但通常等待 12 小時到一天的時間確認細胞均貼附完畢，才會更換培養基 (因為在凍細胞的時候會使用 DMSO，而過多的 DMSO 會不利於細胞生長，故須待細胞貼附後更換培養基)。細胞以 29 小時分裂一次之速率生長，約三至四天須更換新鮮培養基。一般而言，由於 MCF-7 細胞易聚集在一起而不易鋪滿培養皿，若細胞多於九成滿的情況下，多餘之細胞會自行脫附培養皿而死亡。因此培養皿中細胞約八至九成滿時需繼代培養 (sub-culture) 程序。
- (4) 先移去培養基後以 5 mL PBS 輕柔的潤洗培養皿二次，以移除剩餘培養基。
- (5) 加入 1 mL Trypsin-EDTA，令其能潤洗過所有細胞，置於 37 °C 培養箱作用 3 分鐘，進行 trypsination 使細胞脫附。
- (6) 加入 4 mL 10% FBS/DMEM 培養基沖下細胞，將細胞液以 1250 rpm 離心 5 分鐘，移去含有 Trypsin-EDTA 之上清液。
- (7) 加入 10% FBS/DMEM 培養基於適當稀釋倍數下，取 10 μ L 細胞液加入 10 μ L Trypan blue solution 均勻混合後，取適當量低於血清計數器上，再利用倒立式顯微鏡計算細胞個數。血清計數器形狀與其在顯微鏡下觀察如圖 (a) 所示，主要計數四個角落區塊 (以黃色框表示) 之細胞總數。由於一個區塊之體積為 1 mm \times 1 mm \times 0.1 mm = 0.1 mm³ = 1 \times 10⁻⁴ mL，故計數出之數值可利用下式回推細胞液濃度。

Average number of cells counted $\times 10^4 =$ number of cells/mL



圖(a) 血清計數器與其在顯微鏡下觀察之細胞 (藍色點)。

(8) 令細胞濃度為 1×10^6 個/mL 後，取 1 mL 細胞懸浮液加入裝有 8 mL 10% FBS/DMEM 培養基之新培養皿繼續培養，完成至此步驟稱為繼代培養 (存脆繼代的話不需計數，憑經驗繼代即可)。

(9) 若要凍細胞的話，在此之前，須先將細胞液以 1250 rpm 離心 5 分鐘後移去上清液，加入含 5% DMSO 作抗凍劑之 10% FBS/DMEM 培養基，然後計數細胞令細胞濃度為 1×10^6 個/mL，最後分裝於細胞冷凍管中 (1 mL/tube)。以循序方式降溫： 4°C 冰箱 10 分鐘 $\rightarrow -20^\circ\text{C}$ 冰箱 30 分鐘 $\rightarrow -80^\circ\text{C}$ 冰箱 overnight \rightarrow 液氮桶儲存，即可保存細胞。

5. 雌二醇螢光分子對 MCF-7 乳癌細胞測試之實驗流程

(1) 利用倒立式螢光顯微鏡進行分子濃度和培養時間最佳化實驗

i. 於實驗前一天進行繼代培養，利用血清計數器求得細胞濃度後，將細胞移入 12 孔盤，使細胞濃度為 5×10^4 個/well，並培養 20-24 小時使之貼附。

ii. 吸除細胞培養液，利用 1 mL PBS 溶液潤洗兩次，每次 3-5 分鐘，加入 1 mL 利用細胞培養基稀釋成濃度為 10 或 50 μM 的螢光分子 DMSO 溶液 (螢光分子原溶於滅過菌之 DMSO 溶劑中，濃度為 1×10^{-2} M)，於 37°C 培養 2, 6, 12 小時後，吸除



上清液，利用 1 mL PBS 溶液潤洗兩次，每次 3-5 分鐘，將 12 孔盤直接移至倒立式螢光顯微鏡觀察之。

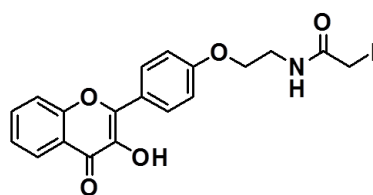
(2) 雷射掃描式共軛焦電子顯微鏡之樣品製備流程

- i. 將細胞種入孔盤前，須先將圓形蓋玻片置入孔盤底部，如此細胞便可貼附在蓋玻片上，以利於之後製作玻片標本。
- ii. 於實驗前一天利用血清計數器求得細胞濃度後，將細胞移入 12 孔盤，使細胞濃度為 5×10^4 個/well，並培養 20-24 小時使之貼附後，吸除細胞培養液，利用 1 mL PBS 溶液潤洗兩次，每次 3-5 分鐘。
- iii. 加入 1 mL 利用細胞培養基稀釋成濃度為 $50 \mu\text{M}$ 的螢光分子 DMSO 溶液（螢光分子原溶於滅過菌之 DMSO 溶劑中，濃度為 $1 \times 10^{-2} \text{M}$ ），於 37°C 培養 12 小時後，吸除上清液，利用 1 mL PBS 溶液潤洗兩次，每次 3-5 分鐘。
- iv. 加入 1 mL/well 的 3.7% 甲醛水溶液將細胞殺死並固定於蓋玻片上，常溫下等待 10 分鐘後吸除上清液，利用 1 mL PBS 溶液潤洗兩次，每次 3-5 分鐘（此步為控制細胞死後形態之重要步驟，加入甲醛水溶液時須慢慢加，且盡量避免劇烈搖晃）。
- v. 若不進行細胞骨架染色，則於載玻片上滴 1 滴封片劑（不能有氣泡），將蓋玻片之細胞貼附面朝下蓋於封片劑上，最後再利用指甲油塗抹在蓋玻片周圍以固定樣品，即完成樣品的製備。

若要進行細胞骨架染色，則於步驟 iv 後繼續進行以下步驟：

- vi. 加入 1 mL/well 的 triton X-100 試劑將細胞膜打洞以利試劑進入，常溫下等待 5 分鐘後吸除上清液，利用 1 mL PBS 溶液潤洗兩次，每次 3-5 分鐘。
- vii. 加入 1 mL/well 的 1% BSA (bovine serum albumin) 避免非專一性結合，常溫下等待 30 分鐘後吸除上清液，利用 1 mL PBS 溶液潤洗兩次，每次 3-5 分鐘。
- viii. 利用 PBS 溶液以 1 比 100 倍條件稀釋 rhodamine phalloidin，加入 1 mL/well，在常溫暗室培養 15 分鐘即可將細胞骨架染色，吸除上清液，利用 1 mL PBS 溶液潤洗兩次，每次 3-5 分鐘。
- ix. 重複步驟 v 進行封片後，即完成樣品的製備。

三、合成步驟及光譜數據

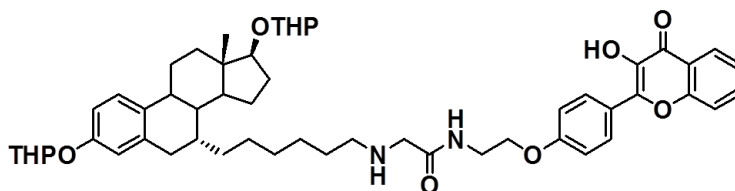


13

N-(2-(4-(3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)phenoxy)ethyl)-2-iodoacetamide (13)

將化合物 **4'-EA-3-HF** (0.4966 克, 1.670 毫莫耳) 和碘乙酸-*N*-羥基琥珀醯亞胺酯 (0.6139 克, 2.169 毫莫耳) 置於含有磁石之 250 毫升圓底瓶中, 加入氯仿 (90 毫升), 溶液呈黃色懸浮混濁狀, 在室溫下反應 1 小時, 反應過程中溶液先變為淡黃白色混濁最後變為澄清。待反應完成減壓濃縮後可得粗產物, 再經由加壓矽膠管柱層析法分離純化, 沖提液為甲醇/氯仿 (1:50), 可得乳白色固體化合物 **13** (0.6704 克), 產率為 86%。

m.p. 192-194 °C; TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/50) R_f = 0.33; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.22 (m, 3H), 7.68 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.95 (br, 1H), 6.50 (br, 1H), 4.13 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.72 (m, 4H); HRMS (ESI) calcd. for C₁₉H₁₇INO₅ (M+H)⁺: 466.0146, found : 466.0144.



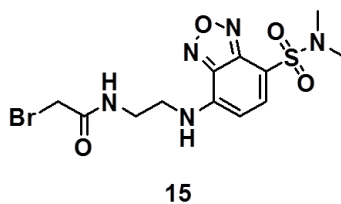
14

N-(2-(4-(3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)phenoxy)ethyl)-2-(((6-((7R,13S,17S)-13-methyl-3,17-bis((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl)hexyl)amino)acetamide (14)

將化合物 **8** (96.2 毫克, 0.178 毫莫耳) 置於含有磁石之 10 毫升圓底瓶中, 加

入二甲基甲醯胺 (0.18 毫升) 使之溶解，打入 *N,N*-二異丙基乙基胺 (0.0104 毫升，0.0594 毫莫耳)；另外將化合物 **13** (29.3 毫克，0.0630 毫莫耳) 加入二甲基甲醯胺 (3 毫升) 溶解後，利用針筒式幫浦在常溫下慢慢滴入化合物 **8** 中 (約 0.4 毫升/小時)，持續滴入 9 小時後，利用高真空抽乾溶劑，再用甲醇帶 3 次可得粗產物，最後經由加壓矽膠管柱層析法分離純化，沖提液為甲醇/二氯甲烷 (3:47)，可得黃色發泡狀液體化合物 **14** (47.8 毫克)，產率為 87%。

TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/24) R_f = 0.3; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.23-8.19 (m, 3H), 7.72 (br, 1H), 7.68-7.64 (m, 1H), 7.54 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.38 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.80 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.36-5.33 (m, 1H), 4.65-4.60 (m, 1H), 4.11 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.93-3.85 (m, 2H), 3.72-3.66 (m, 3H), 3.63-3.61 (m, 1H), 3.59-3.54 (m, 2H), 3.48-3.43 (m, 1H), 3.26 (s, 2H), 2.83 (d, J = 18.7 Hz, 1H), 2.67 (dd, J = 16.8, 3.5 Hz, 1H), 2.54 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.28-2.22 (m, 3H), 2.07-1.92 (m, 3H), 1.87-1.79 (m, 4H), 1.72-0.96 (m, 30H), 0.76 (d, J = 7.6 Hz, 3H); HRMS (ESI) calcd. for C₅₃H₆₉N₂O₉ (M+H)⁺: 877.5003, found: 877.5015.

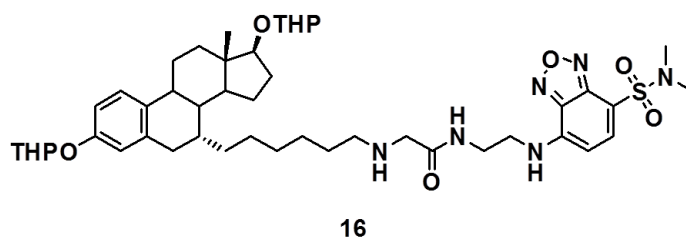


2-bromo-*N*-(2-((7-(*N,N*-dimethylsulfamoyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)ethyl)acetamide (15)

將溴乙酸-*N*-羥基琥珀醯亞胺酯 (0.2173 克，0.9207 毫莫耳) 置於含有磁石之 25 毫升圓底瓶中，加入四氫呋喃 (8.5 毫升) 使之溶解；另外將化合物 **7-EDADBD** (0.2021 克，0.7083 毫莫耳) 加入四氫呋喃 (0.7 毫升) 溶解後 (呈橘色混濁)，利用

針筒式幫浦將化合物 **7-EDADBD** 在常溫下慢慢滴入含有磁石之反應瓶中，(約 0.35 毫升/小時)，持續滴入 2 小時後，抽氣過濾掉未反應完之起始物固體，濾液經減壓濃縮後可得粗產物，先以二氯甲烷再結晶純化，剩下再結晶液的部分再經由加壓矽膠管柱層析法分離純化，沖提液為甲醇/二氯甲烷 (3:47)，可得黃色固體化合物 **15** (0.1174 克)，產率為 41%，回收起始物後產率為 91% (brsm)。

m.p. 186-188 °C; TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 3/47) R_f = 0.34; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.89 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.39 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.58 (m, 4H), 2.80 (s, 6H); HRMS (ESI) calcd. for C₁₂H₁₅N₅O₄SBr (M+H)⁺: 404.0028, found : 404.0043.

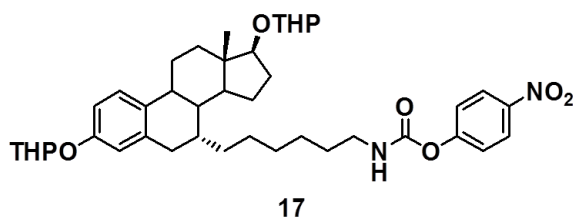


N-2-((7-(*N,N*-dimethylsulfamoyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)ethyl)-2-((6-((7*R*,13*S*,17*S*)-13-methyl-3,17-bis((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-7-yl)hexyl)amino)acetamide
(16)

將化合物 **8** (83.9 毫克，0.155 毫莫耳) 置於含有磁石之 10 毫升圓底瓶中，加入二甲基甲醯胺 (0.16 毫升) 使之溶解，打入 *N,N*-二異丙基乙基胺 (0.009 毫升，0.0518 毫莫耳)；另外將化合物 **15** (21.8 毫克，0.0537 毫莫耳) 加入二甲基甲醯胺 (2.6 毫升) 溶解後，利用針筒式幫浦在常溫下慢慢滴入化合物 **8** 中 (約 0.26 毫升/小時)，持續滴入 10 小時後，利用高真空抽乾溶劑，再用甲醇帶 3 次可得粗產物，最後經由加壓矽膠管柱層析法分離純化，沖提液為甲醇/二氯甲烷 (3:47)，可得橘色發泡狀液體化合物 **16** (52.6 毫克)，產率為 98%。

TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 3/47) R_f = 0.26; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (d, J = 8.0

Hz, 1H), 7.79 (br, 1H), 7.17-7.14 (m, 1H), 7.00 (br, 1H), 6.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.08 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.35-5.33 (m, 1H), 4.64-4.62 (m, 1H), 3.90-3.88 (m, 2H), 3.72-3.45 (m, 8H), 3.27 (s, 2H), 2.87-2.81 (m, 7H), 2.69 (dd, $J = 16.7, 4.1$ Hz, 1H), 2.52 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.30-2.27 (m, 2H), 2.04-1.80 (m, 10H), 1.68-0.99 (m, 33H), 0.77 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H); HRMS (ESI) calcd. for $C_{46}H_{69}N_6O_8S$ (M+H)⁺: 865.4898, found: 865.4840.

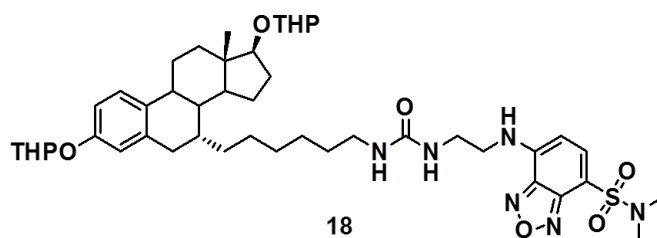


4-nitrophenyl-(6-((7R,13S,17S)-3,17-dihydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl)hexyl)carbamate (17)

將二(對硝基苯)碳酸酯 (0.1896 克, 0.6222 毫莫耳) 置於含有磁石之 10 毫升圓底瓶中, 加入二氯甲烷 (3.74 毫升) 使之溶解, 打入 *N,N*-二異丙基乙基胺 (0.16 毫升, 0.9348 毫莫耳); 另外將化合物 **8** (0.1682 克, 0.3116 毫莫耳) 加入二氯甲烷 (0.94 毫升) 溶解後, 利用針筒式幫浦在常溫下慢慢滴入含有磁石之反應瓶中 (約 0.94 毫升/小時), 持續滴入 1 小時後, 加入飽和碳酸氫鈉水溶液和二氯甲烷萃取, 所得之有機層再以飽和碳酸氫鈉水溶液萃兩次, 最後以飽和食鹽水溶液萃一次, 收集有機層, 經無水硫酸鎂乾燥、過濾和減壓濃縮後可得粗產物, 以加壓矽膠管柱層析法分離純化, 沖提液為乙酸乙酯/正己烷 (1:3), 可得無色發泡狀液體化合物 **17** (0.1724 克), 產率為 79%。

TLC (EtOAc/Hexane = 1/3) $R_f = 0.27$; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.18-7.15 (m, 1H), 6.82 (dd, $J = 8.9, 2.1$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.37-5.34 (m, 1H), 5.16 (br, 1H), 4.67-4.62 (m, 1H), 3.95-3.87

(m, 2H), 3.72 (m, 1H), 3.59-3.56 (m, 1H), 3.49-3.44 (m, 1H), 3.23 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.86 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 2.70 (dd, $J = 16.8, 5.3$ Hz, 1H), 2.34-2.24 (m, 2H), 2.09-1.80 (m, 6H), 1.76-0.97 (m, 29H), 0.79 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H); HRMS (ESI) calcd. for $C_{41}H_{56}N_2O_8Na$ ($M+Na$)⁺: 727.3934, found: 727.3940.

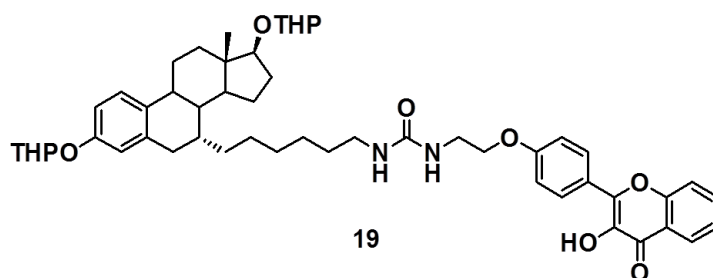


***N,N*-dimethyl-7-((2-(3-(6-((7*R*,13*S*,17*S*)-13-methyl-3,17-bis((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl)hexyl)ureido)ethyl)amino)benzo[c][1,2,5]oxadiazole-4-sulfonamide (18)**

將化合物 **17** (73.1 毫克, 0.1037 毫莫耳) 和化合物 **7-EDADBD** (37.4 毫克, 0.1311 毫莫耳) 置於含有磁石之 10 毫升圓底瓶中, 加入二氯甲烷 (2 毫升) 使之溶解 (呈橘黃色混濁), 打入 *N,N*-二異丙基乙基胺 (0.054 毫升, 0.3111 毫莫耳) 後便呈橘黃色澄清, 常溫下反應 1.5 小時。加入飽和碳酸氫鈉水溶液和二氯甲烷萃取, 所得之有機層再以飽和碳酸氫鈉水溶液萃兩次, 最後以飽和食鹽水溶液萃一次, 收集有機層, 經無水硫酸鎂乾燥、過濾和減壓濃縮後可得粗產物, 以加壓矽膠管柱層析法分離純化, 沖提液為甲醇/二氯甲烷 (1:24), 可得橘色發泡狀液體化合物 **18** (53.4 毫克), 產率為 61%。

TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/24) $R_f = 0.35$; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.26 (br, 1H), 7.17-7.14 (m, 1H), 6.81-6.79 (m, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.35-5.31 (m, 1H), 5.25 (br, 1H), 4.81 (br, 1H), 4.64-4.62 (m, 1H), 3.93-3.86 (m, 2H), 3.71 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.59-3.40 (m, 6H), 3.10 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.86-2.80 (m, 7H), 2.67 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 2.26-2.24 (m, 2H), 2.07-1.78 (m, 8H),

1.72-0.94 (m, 29H), 0.77 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H); HRMS (ESI) calcd. for $C_{45}H_{66}N_6O_8NaS$ ($M+Na$)⁺: 873.4561, found : 873.4561.

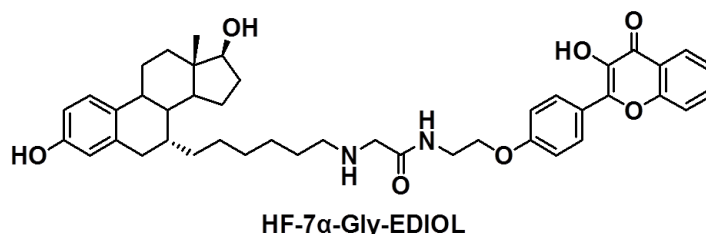
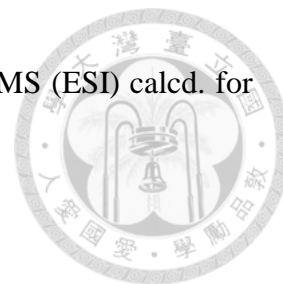


1-(2-(4-(3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)phenoxy)ethyl)-3-(6-((7R,13S,17S)-13-methyl-3,17-bis((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl)hexyl)urea (19)

將化合物 **17** (84.6 毫克, 0.1200 毫莫耳) 和化合物 **4'-EA-3-HF** (42.0 毫克, 0.1413 毫莫耳) 置於含有磁石之 10 毫升圓底瓶中, 加入二氯甲烷 (2.4 毫升) 使之溶解 (呈黃色混濁), 打入 *N,N*-二異丙基乙基胺 (0.063 毫升, 0.3600 毫莫耳), 常溫下反應 4 小時發現起始物還剩很多, 便再加入 4-二甲氨基吡啶 (19.0 毫克, 0.1560 毫莫耳) 催化反應, 常溫下再反應 18 小時。加入 10% 鹽酸:水=1:5 和二氯甲烷進行萃取, 重複此動作 2 次 (共 3 次), 有機層再以飽和碳酸氫鈉水溶液萃 3 次, 最後以飽和食鹽水溶液萃一次, 收集有機層, 經無水硫酸鎂乾燥、過濾和減壓濃縮後可得粗產物, 以加壓矽膠管柱層析法分離純化, 沖提液為甲醇/二氯甲烷 (1:24), 可得黃色發泡狀液體化合物 **19** (39.2 毫克), 產率為 38%。

TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/24) $R_f = 0.33$; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20-8.15 (m, 3H), 7.67-7.60 (m, 1H), 7.53-7.49 (m, 1H), 7.36 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.14 (m, 1H), 7.01 (br, 1H), 6.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.80 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 5.36-5.32 (m, 1H), 5.06 (br, 1H), 4.71 (br, 1H), 4.64-4.60 (m, 1H), 4.06 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.94-3.86 (m, 2H), 3.72-3.67 (m, 1H), 3.62-3.55 (m, 3H), 3.47-3.44 (m, 1H), 3.14-3.09 (m, 2H), 2.83 (d, $J = 18.4$ Hz, 1H), 2.67 (dd, $J = 16.6, 4.7$ Hz, 1H), 2.26-2.24

(m, 2H), 2.05-1.78 (m, 8H), 1.69-0.94 (m, 28H), 0.77 (m, 3H); HRMS (ESI) calcd. for $C_{52}H_{67}N_2O_9$ (M+H)⁺: 863.4847, found : 863.4848.

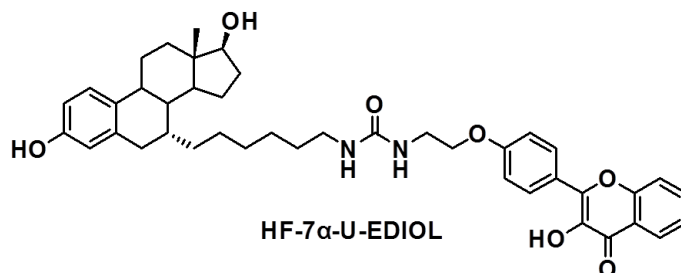


2-((6-((7R,13S,17S)-3,17-dihydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl)hexyl)amino)-N-(2-(4-(3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)phenoxy)ethyl)acetamide (HF-7α-Gly-EDIOL)

將化合物 **14** (49.7 毫克, 0.0567 毫莫耳)、對甲苯磺酸吡啶鹽 (18.1 毫克, 0.0720 毫莫耳) 置於含有磁石之 10 毫升圓底瓶中, 先加入二氯甲烷 (1 毫升) 使化合物 **14** 溶解, 再加入乙醇 (4 毫升), 加熱至 55 °C 反應 24 小時。待反應完成後冷卻至室溫, 減壓濃縮後可得粗產物, 再經由加壓矽膠管柱層析法分離純化, 沖提液為甲醇/二氯甲烷 (1:9), 可得黃綠色固體化合物 **HF-7α-Gly-EDIOL** (36.1 毫克), 產率為 90%。

TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/12) R_f = 0.26; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃+trace MeOD) δ 8.17-8.13 (m, 3H), 7.63 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.35 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.54 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.05 (t, J = 4.7 Hz, 2H), 3.64-3.58 (m, 3H), 3.19 (s, 2H), 2.74 (dd, J = 16.8, 4.8 Hz, 1H), 2.57 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 2.46 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.20-2.11 (m, 2H), 2.02-1.93 (m, 1H), 1.81 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 1.61-0.90 (m, 21H), 0.67 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃+trace MeOD) δ 173.3, 172.4, 159.9, 155.1, 154.2, 145.7, 137.8, 136.7, 133.4, 130.9, 129.6, 126.8, 125.2, 124.5, 123.9, 120.8, 118.1, 116.0, 114.4, 112.8, 81.6, 66.7, 53.3, 51.8, 49.8, 46.4, 43.2, 41.9, 38.4, 38.3, 38.0, 36.8, 34.5, 33.2,

30.0, 29.4, 27.7, 27.2, 26.8, 25.2, 22.5, 14.0, 10.9; IR (neat) 3337, 2925, 2854, 1655, 1603, 1561, 1509, 1469, 1427, 1407, 1254, 1182, 1118, 1054, 834, 758 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd. for $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ : 709.3847, found : 709.3813.

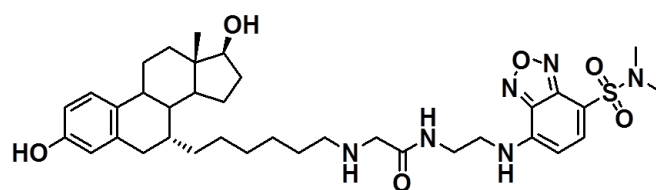


1-(6-((7*R*,13*S*,17*S*)-3,17-dihydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-7-yl)hexyl)-3-(2-(4-(3-hydroxy-4-oxo-4*H*-chromen-2-yl)phenoxy)ethyl)urea (HF-7 α -U-EDIOL)

將化合物 **19** (39.2 毫克, 0.0454 毫莫耳)、對甲苯磺酸吡啶鹽 (17.1 毫克, 0.0680 毫莫耳) 置於含有磁石之 10 毫升圓底瓶中, 先加入二氯甲烷 (1 毫升) 使化合物 **19** 溶解, 再加入乙醇 (2 毫升), 加熱至 55 $^{\circ}\text{C}$ 反應 15 小時。待反應完成後冷卻至室溫, 減壓濃縮後可得粗產物, 再經由加壓矽膠管柱層析法分離純化, 沖提液為甲醇/二氯甲烷 (3:47), 可得淡黃色固體化合物 **HF-7 α -U-EDIOL** (23.0 毫克), 產率為 73%。

m.p. 150-152 $^{\circ}\text{C}$; TLC (MeOH/ CH_2Cl_2 = 3/47) R_f = 0.27; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 +trace MeOD) δ 8.11-8.09 (m, 3H), 7.62-7.58 (m, 1H), 7.47 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.31 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.55 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 3.99 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.61 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 3.51 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.03 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.74 (dd, J = 16.8, 4.9 Hz, 1H), 2.58 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 2.20-2.14 (m, 2H), 2.03-1.94 (m, 1H), 1.81 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 1.61-0.90 (m, 20H), 0.67 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 +trace MeOD) δ 173.3, 160.0, 158.9, 155.1, 154.2, 145.8, 137.7, 136.7, 133.4, 130.8, 129.5, 126.7, 125.1,

124.4, 123.7, 120.7, 118.0, 116.0, 114.4, 112.8, 51.5, 67.7, 46.3, 43.2, 41.9, 40.2, 39.5, 38.0, 36.7, 34.5, 33.1, 29.9, 29.5, 29.4, 27.8, 27.1, 26.7, 25.2, 22.5, 17.9, 10.9; IR (neat) 3747, 3647, 3333, 2924, 1715, 1748, 1682, 1646, 1601, 1564, 1557, 1507, 1405, 1249, 1180, 1108, 897, 833, 756 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd. for $\text{C}_{42}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 693.3540, found: 693.3535.



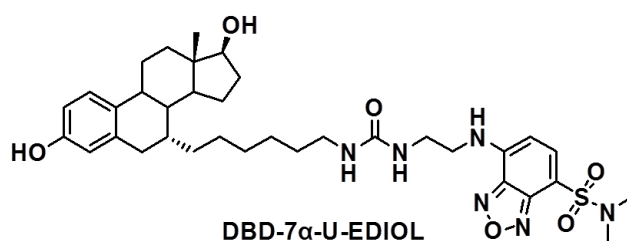
DBD-7 α -Gly-EDIOL

2-((6-((7*R*,13*S*,17*S*)-3,17-dihydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-7-yl)hexyl)amino)-*N*-(2-((7-(*N,N*-dimethylsulfamoyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)ethyl)acetamide (DBD-7 α -Gly-EDIOL)

將化合物 **16** (45.3 毫克, 0.0524 毫莫耳)、對甲苯磺酸吡啶鹽 (30.8 毫克, 0.123 毫莫耳) 置於含有磁石之 10 毫升圓底瓶中, 先加入二氯甲烷 (0.5 毫升) 使化合物 **16** 溶解, 再加入乙醇 (2 毫升), 加熱至 55 $^{\circ}\text{C}$ 反應 2 天。待反應完成後冷卻至室溫, 減壓濃縮後可得粗產物, 再經由加壓矽膠管柱層析法分離純化, 沖提液為甲醇/二氯甲烷 (1:9), 可得鮮橘色固體化合物 **DBD-7 α -Gly-EDIOL** (29.1 毫克), 產率為 80%。

m.p. 125-127 $^{\circ}\text{C}$; TLC (MeOH/ CH_2Cl_2 = 1/9) R_f = 0.31; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.86 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.34 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.67 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 3.57 (s, 4H), 3.20 (s, 2H), 2.84-2.79 (m, 7H), 2.68 (d, J = 17.0 Hz, 1H), 2.47 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.32-2.24 (m, 2H), 2.08-2.01 (m, 1H), 1.93-1.90 (m, 1H), 1.74-1.71 (m, 1H), 1.60-0.96 (m, 19H), 0.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 +trace MeOD) δ 173.6, 154.1, 146.2, 144.2, 141.1,

141.0, 139.6, 136.7, 130.8, 126.8, 115.9, 112.8, 108.3, 98.5, 81.5, 51.7, 49.8, 46.3, 43.8, 43.6, 43.2, 41.9, 38.0, 37.6, 36.7, 34.5, 33.2, 29.9, 29.5, 29.4, 27.7, 27.1, 26.8, 25.2, 22.5, 10.9; IR (neat) 3306, 2925, 2855, 1575, 1558, 1526, 1428, 1339, 1183, 1130, 965, 710, 690 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ : 697.3747, found : 697.3767.

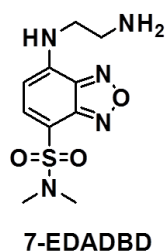


7-((2-(3-(6-((7*R*,13*S*,17*S*)-3,17-dihydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-7-yl)hexyl)ureido)ethyl)amino)-*N,N*-dimethylbenzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-4-sulfonamide (DBD-7 α -U-EDIOL)

將化合物 **18** (53.4 毫克, 0.0627 毫莫耳)、對甲苯磺酸吡啶鹽 (28.7 毫克, 0.114 毫莫耳) 置於含有磁石之 10 毫升圓底瓶中, 先加入二氯甲烷 (1 毫升) 使化合物 **18** 溶解, 再加入乙醇 (2 毫升), 加熱至 55 $^{\circ}\text{C}$ 反應 24 小時。待反應完成後冷卻至室溫, 減壓濃縮後可得粗產物, 再經由加壓矽膠管柱層析法分離純化, 沖提液為甲醇/二氯甲烷 (3:47), 可得鮮橘色固體化合物 **DBD-7 α -U-EDIOL** (43.4 毫克), 產率為 100%。

m.p. 149-151 $^{\circ}\text{C}$; TLC (MeOH/ CH_2Cl_2 = 3/47) R_f = 0.30; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 +trace MeOH) δ 7.75 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.54 (dd, J = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.04 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.62 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 3.42-3.37 (m, 4H), 3.03-2.99 (m, 2H), 2.78-2.74 (m, 7H), 2.59 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 2.23-2.15 (m, 2H), 2.02-1.95 (m, 1H), 1.83-1.80 (m, 1H), 1.63-1.61 (m, 1H), 1.54-0.87 (m, 19H), 0.68 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 +trace MeOD) δ 159.6, 154.1,

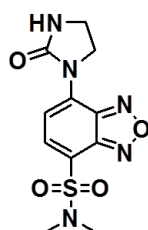
146.3, 144.2, 141.3, 139.9, 136.8, 131.0, 126.8, 116.0, 112.8, 107.5, 98.4, 81.6, 46.4, 44.8, 43.2, 41.9, 40.3, 38.5, 38.1, 37.7, 36.8, 34.6, 33.2, 30.0, 29.8, 29.4, 27.8, 27.2, 26.6, 25.2, 22.5, 11.0; IR (neat) 3332, 2923, 2854, 1646, 1609, 1575, 1499, 1428, 1339, 1257, 1183, 1142, 966, 715 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$ (M-H)⁻ : 681.3434, found : 681.3409.



7-((2-aminoethyl)amino)-*N,N*-dimethylbenzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-4-sulfonamide (7-EDADBD)¹⁰⁰

將化合物 **12** (0.2922 克, 1.117 毫莫耳) 置於含有磁石之 10 毫升雙頸瓶中, 加入乙腈 (4.38 毫升) 使之溶解, 在常溫下加入乙二胺 (2.92 毫升), 升溫至 60 °C 反應 2 小時。待反應完成後冷卻至室溫, 先轉置 (transfer) 至單頸瓶中, 減壓濃縮後可得粗產物, 再經由加壓矽膠管柱層析法分離純化, 沖提液為甲醇/二氯甲烷 (1:9) + 1% TEA, 可得橘色固體化合物 **7-EDADBD** (0.3015 克), 產率為 95%。

m.p. 140-142 °C; TLC (MeOH/ CH_2Cl_2 = 1/9+1% TEA) R_f = 0.31; ^1H NMR (400 MHz, MeOD+trace CDCl_3) δ 7.89 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.66 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.15 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.80 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 146.5, 145.6, 144.3, 141.6, 140.4, 105.1, 98.8, 45.5, 37.5; IR (neat) 3368, 2873, 1583, 1525, 1457, 1429, 1394, 1335, 1253, 1190, 1139, 1050, 1018, 997, 965, 948, 893, 867, 831, 780, 710 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ (M+H)⁺ : 286.0974, found : 286.0981.



7-IDBD

***N,N*-dimethyl-7-(2-oxoimidazolidin-1-yl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-4-sulfonamide
(7-IDBD)**

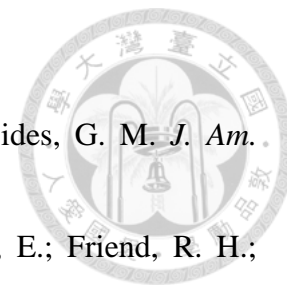
將化合物 **7-EDADB** (26.5 毫克, 0.0929 毫莫耳) 置於含有磁石之 20 毫升樣品瓶中, 加入二氯甲烷 (9.29 毫升) 使之溶解 (呈混濁狀), 再加入三乙胺 (5 滴) 和事先配置好之 0.1 M 三光氣 (650 微升), 在室溫下反應 3 小時後溶液變澄清。先轉置至圓底瓶中, 減壓濃縮後可得粗產物, 再經由加壓矽膠管柱層析法分離純化, 沖提液為甲醇/二氯甲烷 (1:24), 可得鮮黃綠色固體化合物 **7-IDBD** (28.2 毫克), 產率為 98%。

m.p. 258-260 °C; TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/24) R_f = 0.36; ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 8.22 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.75 (br, 1H), 4.54 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.53 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.75 (s, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 158.0, 146.4, 145.4, 138.1, 134.6, 114.2, 112.2, 47.2, 37.4, 37.0; IR (neat) 3205, 3118, 2360, 2342, 1732, 1540, 1475, 1409, 1394, 1344, 1330, 1266, 1189, 1138, 970, 942, 854, 749, 721 cm⁻¹; HRMS (ESI) calcd. for C₁₁H₁₂N₅O₄S (M+H)⁺ : 310.0610, found : 310.0617.

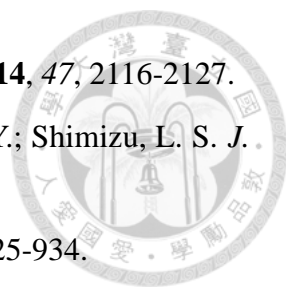
參考文獻



1. Lehn, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1304-1319.
2. Lehn, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89-112.
3. Lehn, J. M. *Science* **1993**, 260, 1762-1763.
4. Oshovsky, G. V.; Reinhoudt, D. N.; Verboom, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2366-2393.
5. Jang, Y.; Champion, J. A. *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 2188-2198.
6. Lehn, J. M.; Ball, P. *The New Chemistry*; Cambridge University Press: Cambridge, 2000.
7. Desiraju, G. R. *Crystal Engineering: The Design of Organic Solids*; Elsevier: New York, 1989.
8. Evans, D. F.; Wennerstrom, H. *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet*; Wiley: New York, 1999.
9. Jones, M. N.; Chapman, D. *Micelles, Monolayers, and Biomembranes*; Wiley-Liss: New York, 1995.
10. Thomas, E. L. *Science* **1999**, 286, 1307.
11. Kumar, A.; Abbott, N. A.; Kim, E.; Biebuyck, H. A.; Whitesides, G. M. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 219-226.
12. Grantcharova, V.; Alm, E. J.; Baker, D.; Horwich, A. L. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, 70-82.
13. Neidle, S. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*; Oxford Univ. Press: Oxford, 1999.
14. Bongrand, P. *Rep. Prog. Phys.* **1999**, 62, 921-968.
15. Whitesides, G. M.; Boncheva, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 4769-4774.
16. Olenyuk, B.; Whiteford, J. A.; Fechtenkotter, A.; Stang, P. J. *Nature* **1999**, 398, 796-799.
17. Lehn, J. M. *NATO ASI Ser. Ser. E* **1996**, 320, 511-524.
18. Lombardo, D.; Kiselev, M. A.; Magazù, S.; Calandra, P. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015**, 2015, Article ID 151683.
19. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Molecular*




- Biology of the Cell*; Garland: New York, 1994.
20. Schwiebert, K. E.; Chin, D. N.; MacDonald, J. C.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4018-4029.
 21. Schmidt-Mende, L.; Fechtenkotter, A.; Mullen, K.; Moons, E.; Friend, R. H.; MacKenzie, J. D. *Science* **2001**, *293*, 1119-1122.
 22. De Rosa, C.; Park, C.; Thomas, E. L.; Lotz, B. *Nature* **2000**, *405*, 433-437.
 23. Whitesides, G. M. *Sci. Am.* **1995**, *273*, 146-149.
 24. Holmberg, K.; Jonsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*; John Wiley & Sons: Chichester, 2nd edition, 2002.
 25. Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*; Wiley: New York, 2nd edition, 1989.
 26. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*; Academic Press: New York, 1985.
 27. Paramonov, S. E.; Jun, H. W.; Hartgerink, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7291-7298.
 28. Stendahl, J. C.; Rao, M. S.; Guler, M. O.; Stupp, S. I. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 499-508.
 29. Tang, C.; Ulijn, R. V.; Saiani, A. *Langmuir* **2011**, *27*, 14438-14449.
 30. Santoso, S.; Hwang, W.; Hartman, H.; Zhang, S. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 687-691.
 31. Goodman, C. M.; Choi, S.; Shandler, S.; DeGrado, W. F. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 252-262.
 32. Vriezema, D. M.; Aragones, M. C.; Elemans, J. A. A. W.; Cornelissen, J. J. L. M.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1445-1489.
 33. Fong, C.; Wells, D.; Krodkiewska, I.; Hartley, P. G.; Drummond, C. J. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 594-597.
 34. Etter, M. C.; Urbanczyk-Lipkowska, Z.; Zia-Ebrahimi, M.; Panunto, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8415-8426.
 35. Zhao, X.; Chang, Y. L.; Fowler, F. W.; Lauher, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6627-6634.
 36. Laliberté, D.; Maris, T.; Wuest, J. D. *Can. J. Chem.* **2004**, *82*, 386-398.
 37. Custelcean, R. *Chem. Commun.* **2008**, 295-307.
 38. Steed, J. W. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3686-3699.

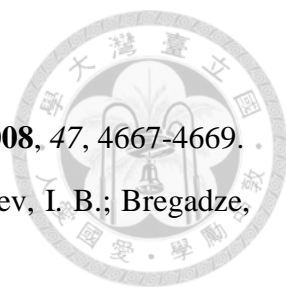
- 
39. Shimizu, L. S.; Salpage, S. R.; Korous, A. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2116-2127.
40. Yang, J.; Dewal, M. B.; Sobransingh, D.; Smith, M. D.; Xu, Y.; Shimizu, L. S. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 102-110.
41. Lim, Y. B.; Moon, K. S.; Lee, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 925-934.
42. Matassini, C.; Parmeggiani, C.; Cardona, F.; Goti, A. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 5407-5415.
43. Mizusawa, K.; Ishida, Y.; Takaoka, Y.; Miyagawa, M.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7291-7293.
44. Fujita, N.; Shinkai, S. *Molecular Gels*; Springer: Netherlands, 2006.
45. 潘福; 李詩慶; 張固剛; 蕭明熙; 尹士俊 *生物化學(下)*; 台灣商務印書館: 台北, 1987.
46. Ben-Zimra, M.; Koler, M.; Melamed-Book, N.; Arensburg, J.; Payne, A. H.; Orly, J. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2002**, *187*, 223-231.
47. Lu, L.; Cocker, T. M.; Bachman, R. E.; Weiss, R. G. *Langmuir* 1999, *16*, 20-34.
48. Svobodová, H.; Noponen, V.; Kolehmainen, E.; Sievänen, E. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 4985-5007.
49. Lin, Y. C.; Kachar, B.; Weiss, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5542-5551.
50. Jing, B.; Chen, X.; Zhao, Y.; Wang, X.; Ma, F.; Yue, X. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2037-2042.
51. Yang, H. K. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 66431-66437.
52. Demchenko, A. P. *J. Fluoresc.* **2010**, *20*, 1099-1128.
53. Wu, P.; Hou, X.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. *Nanoscale* **2016**, *8*, 8427-8442.
54. Lee, M. H.; Kim, J. S.; Sessler, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4185-4191.
55. Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515-1566.
56. Kim, J. S.; Quang, D. T. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3780-3799.
57. Wu, J.; Liu, W.; Ge, J.; Zhang, H.; Wang, P. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3483-3495.
58. Demchenko, A. P.; Tang, K. C.; Chou, P. T. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1379-1408.
59. Fan, J.; Hu, M.; Zhan, P.; Peng, X. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 29-43.
60. Feng, Y.; Cheng, J.; Zhou, L.; Zhou, X.; Xiang, H. *Analyst* **2012**, *137*,


4885-4901.


61. Berney, C.; Danuser, G. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3992-4010.
62. An excimer is located at wavelengths higher than that of the monomer and does not show vibronic bands.
<http://slideplayer.com/slide/8555906/>
63. Wu, J.; Zou, Y.; Li, C.; Sicking, W.; Piantanida, I.; Yi, T.; Schmuck, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1958-1961.
64. Sengupta, P. K.; Kasha, K. *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *68*, 382-385.
65. Caarls, W.; Celej, M. S.; Demchenko, A. P.; Jovin, T. M. *J. Fluoresc.* **2010**, *20*, 181-190.
66. Ameer-Beg, S.; Ormson, S. M.; Brown, R. G.; Matousek, P.; Towrie, M.; Nibbering, E. T. J.; Foggi, P.; Neuwahl, F. V. R. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 3709-3718.
67. Celej, M. S.; Caarls, W.; Demchenko, A. P.; Jovin, T. M. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7465-7472.
68. Swinney, T. C.; Kelley, D. F. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 211-221.
69. Klymchenko, A. S.; Demchenko, A. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12372-12379.
70. Demchenko, A. P. *Introduction to fluorescence sensing*; Springer: Berlin, 2009.
71. Takahashi, Y.; Pacheco Tanaka, D. A.; Matsunaga, H.; Suzuki, T. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 759-762.
72. Klymchenko, A. S.; Pivovarenko, V. G.; Demchenko, A. P. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 4211-4216.
73. Klymchenko, A. S.; Duportail, G.; Mély, Y.; Demchenko, A. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 11219-11224.
74. Klymchenko, A. S.; Duportail, G.; Demchenko, A. P.; Mély, Y. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2929-2941.
75. Liu, B.; Wang, J. F.; Zhang, G.; Bai, R.; Pang, Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 4402-4407.
76. Liu, Y.; Yu, D. H.; Ding, S. S.; Xiao, Q.; Guo, J.; Feng, G. Q. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 17543-17550.
77. Uchiyama, S.; Santa, T.; Imai, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 569-576.



- 
78. Imai, K.; Toyo'oka, T.; Miyano, H. *Analyst* **1984**, *109*, 1365-1373.
79. Okura, Y.; Kai, M.; Nohta, H. *J. Chromatogr. B* **1994**, *659*, 85-107.
80. Heberer, H.; Matschiner, H. *J. prakt. Chem.* **1986**, *328*, 261-274.
81. Lin, S.; Struve, W. S. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 361-365.
82. Loving, G. S.; Sainlos, M.; Imperiali, B. *Trends in Biotechnology* **2010**, *28*, 73-83.
83. Pawelka, Z. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1988**, *84*, 1683-1696.
84. Condon, E. U. *Phys. Rev.* **1928**, *32*, 858-872.
85. Lawrence, J. F.; Frei, R. W. *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 2046-2049.
86. Uchiyama, S.; Santa, T.; Okiyama, N.; Fukushima, T.; Imai, K. *Biomed. Chromatogr.* **2001**, *15*, 295-318.
87. Uchiyama, S.; Matsumura, Y.; Silva, A. P.; Iwai, K. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5926-5935.
88. Zhuang, Y. D.; Chiang, P. Y.; Wang, C. W.; Tan, K. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8124 -8128.
89. 余柔靚, 國立台灣大學理學院化學所碩士論文, 台北市, 2009.
90. 蘇怡文, 國立台灣大學理學院化學所碩士論文, 台北市, 2011
91. Chou, P. T.; Huang, C.; Pu, S. C.; Cheng, Y. M.; Liu, Y. H.; Wang, Y.; Chen, C. T. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 6452-6454.
92. Mitra, K.; Marquis, J. C.; Hillier, S. M.; Rye, P. T.; Zayas, B.; Lee, A. S.; Essigmann, J. M.; Croy, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1862-1863.
93. Tedesco, R.; Fiaschi, R.; Napolitano, E. *Synthesis* **1995**, *1995*, 1493-1495.
94. Boonyarattanakalin, S.; Martin, S. E.; Dykstra, S. A.; Peterson, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16379-16386.
95. 陳俊晏, 國立台灣大學理學院化學所博士論文, 台北市, 2014
96. Pan, L. F.; Wang, X. B.; Xie, S. S.; Li, S.Y.; Kong, L.Y. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 609-616.
97. 劉淳葦, 國立台灣大學理學院化學所碩士論文, 台北市, 2016
98. Liu, T. K.; Hsieh, P. Y.; Zhuang, Y. D.; Hsia, C. Y.; Huang, C. L.; Lai, H. P.; Lin, H. S.; Chen, I. C.; Hsu, H. U.; Tan, K. T. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2359-2365.
99. Pagano, M.; Castagnolo, D.; Bernardini, M.; Fallacara, A. L.; Laurenzana, I.; Deodato, D.; Kessler, U.; Pilger, B.; Stergiou, L.; Strunze, S.; Tintori, C.; Botta,

- 
- M. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 129-150.
100. Uchiyama, S.; Iwai, K.; Silva, A. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4667-4669.
101. Likhoshesterov, L. M.; Novikova, O. S.; Chizhov, A. O.; Sivaev, I. B.; Bregadze, V. I. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **2011**, *60*, 2359-2364.
102. Slater, M. J.; Amphlett, E. M.; Andrews, D. M.; Bamborough, P.; Carey, S. J.; Johnson, M. R.; Jones, P. S.; Mills, G.; Parry, N. R.; Somers, D. O'N.; Stewart, A. J.; Skarzynski, T. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4627-4630.
103. Protti, S.; Mezzetti, A.; Cornard, J. P.; Lapouge, C.; Fagnoni M. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *467*, 88-93.
104. Biolin Scientific instrumentation company : Introduction of critical micelle concentration
http://www.biolinscientific.com/zafepress.php?url=%2Fpdf%2FAttension%2FTheory%20Notes%2FAT_TN_3_cmc.pdf
105. Winternitz, M. C. *Pathology of War Gas Poisoning*; New Haven, CT: Yale University Press, 1920.
106. Prentiss, A. M. *Chemicals in War*; New York: McGraw-Hill, 1937.
107. World Health Organization. *Environmental Health Criteria 193: Phosgene*; Geneva: World Health Organization, 1997.
108. Plastics Daily News, an On-line News Wire Service for the Plastics Industry. Thai workers die from phosgene exposure March 8, 2000.
109. Guo, Y. L.; Kennedy, T. P.; Michael J. R. *J. Appl. Physiol.* **1990**, *69*, 1615-1622.
110. Ghio, A. J.; Kennedy, T. P.; Hatch, G. E.; Tepper, J. S. *J. Appl. Physiol.* **1991**, *71*, 657-665.
111. Diller, W. F. *Toxicol. Ind. Health.* **1985**, *1*, 7-15.
112. Potts, A. M.; Simon, F. P.; Gerard, R. W. *Arch. Biochem.* **1949**, *24*, 329-337.
113. Sciuto, A. M.; Gurtner, G. H. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1989**, *139*, A419.
114. Schroeder, S.; Gurtner, G. H. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1992**, *145*, A606.
115. Jaskot, R. H.; Grose, E. C.; Richards, J. H.; Doefler, D. L. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1991**, *17*, 666-674.
116. Sciuto, A. M.; Strickland, P. T.; Kennedy, T. P.; Gurtner, G. H. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1995**, *151*, 768-772.
117. Sciuto, A. M. *Arch. Toxicol.* **1998**, *72*, 283-288.
118. Sciuto, A. M.; Moran, T. S. *Inhal. Toxicol.* **1999**, *11*, 855-871.

- 
119. Cucinell, S. A. *Arch. Environ. Health*. **1974**, 28, 272-275.
120. Henderson, Y.; Haggard, H. W. *Noxious Gases and the Principles of Respiration. Influencing their Action*; New York: Chemical Catalog Company, 1927.
121. Diller, W. F.; Zante, R. *Zentralbl. für Arbeitsmed.* **1982**, 32, 360-368.
122. Diller, W. F. *J. Occup. Med.* **1978**, 20, 189-193.
123. Rinehart, W. E.; Hatch, T. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **1964**, 25, 545-553.
124. Borak, J.; Diller, W. F. *J. Occup. Environ. Med.* **2001**, 43, 110-119.
125. Kodavanti, U. P.; Costa, D. L.; Giri, S. N.; Starcher, B.; Hatch, G. E. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1997**, 37, 54-63.
126. Selgrade, M. K.; Gilmour, M. I.; Yang, Y. G.; Burleson, G. R.; Hatch, G. E. *Inhal Toxicol.* **1995**, 7, 1257-1268.
127. American Industrial Hygiene Association *Odor Thresholds for Chemicals with Established Occupational Health Standards*; Akron, OH: AIHA, 1989.
128. Lamy, M. *Intensivmedizin. Notfallmedizin. Anaesthesiologie.* **1979**, 16, 230-245.
129. Diller, W. F. *Arbeitsmedizin Aktuell 8.3. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.* **1983**, 113.
130. Diller, W. F.; Zante, R. A. *Toxicol. Ind. Health.* **1985**, 1, 117-128.
131. Toon, G. C.; Blavier, J. F.; Sen, B.; Drouin, B. J. *Geophys. Res. Lett.* **2001**, 28, 2835-2838.
132. Hill, H. H.; Martin, S. J. *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 2281-2291.
133. Harig, R.; Rusch, P.; Dyer, C.; Jones, A.; Moseley, R.; Truscott, B. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2005**, 5995, 599510.
134. Frye-Mason, G.; Leuschen, M.; Wald, L.; Paul, K.; Hancock, L. F. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2005**, 5778, 337-346.
135. Zhang, S. W.; Swager, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3420-3421.
136. Dale, T. J.; Rebek, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4500-4501.
137. Tal, S.; Salman, H.; Abraham, Y.; Botoshansky, M.; Eichen, Y. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4858-4864.
138. Albers, A. E.; Okreglak, V. S.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9640-9641.
139. Knapton, D.; Burnworth, M.; Rowan, S. J.; Weder, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5825-5829.

- 
140. Zhang, H.; Rudkevich, D. M. *Chem. Commun.* **2007**, 46, 1238-1239.
141. Wu, X.; Wu, Z.; Yang, Y.; Han, S. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 1895-1897.
142. Kundu, P.; Hwang, K. C. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 4594-4597.
143. Zhou, X.; Zeng, Y. Y.; Chen, L. Y.; Wu, X.; Yoon, J. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 4729-4733.
144. Hu, Y.; Chen, L. Y.; Jung, H. S.; Zeng, Y. Y.; Lee, S. Y.; Swamy, K. M. K.; Zhou, X.; Kim, M. H.; Yoon, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 22246-22252.
145. Xia, H. C.; Xu, X. H.; Song, Q. H. *ACS Sens.* **2017**, 2, 178-182.
146. Wang, S. L.; Zhong, L.; Song, Q. H. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 1530-1533.
147. Known interferences include hydrogen chloride, chlorinated triazines, dicarbonic acid-diester, chloroformates, carbamoylchloride, tetrachlorocyclopropene and dimethylsulfamoylchloride. Technical Data of Phosgene Indicator Badge Medic. http://www.compur.com/upload/pdf/Bedienungsanleitungen/DE/Medic_mehrspra-chig_2014_1.pdf
148. Known interferences include acyl halides, benzoyl chloride, cyanuric chloride, carbonyl bromide and chloroformates. Operating Instructions of Phosgene Monitor (Part NO.: 382036). <http://www.morphtec.com/file/image/382036-Safe AirPhosgeneDiamond-021117.pdf>
149. Zhang, Y. L.; Peng, A. D.; Jie, X.; Lv, Y. L.; Wang, X. F.; Tian, Z. Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9, 13920-13927.
150. Clark, R. L.; Pessolano, A. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 1657-1662.
151. Henning, R.; Lattrell, R.; Gerhards, H. J.; Leven, M. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 814-819.
152. Pasquato, L.; Modena, G.; Cotarca, L.; Delogu, P.; Mantovani, S. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8224-8228.
153. Long, G. L.; Winefordner, J. D. *Anal. Chem.* **1983**, 55, A712-A724.

附錄

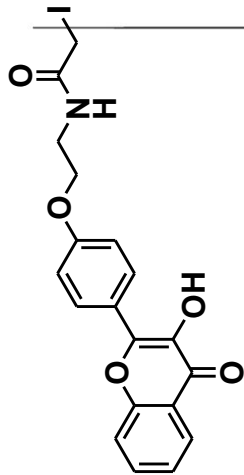
$^1\text{H-NMR}$ 與 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜圖



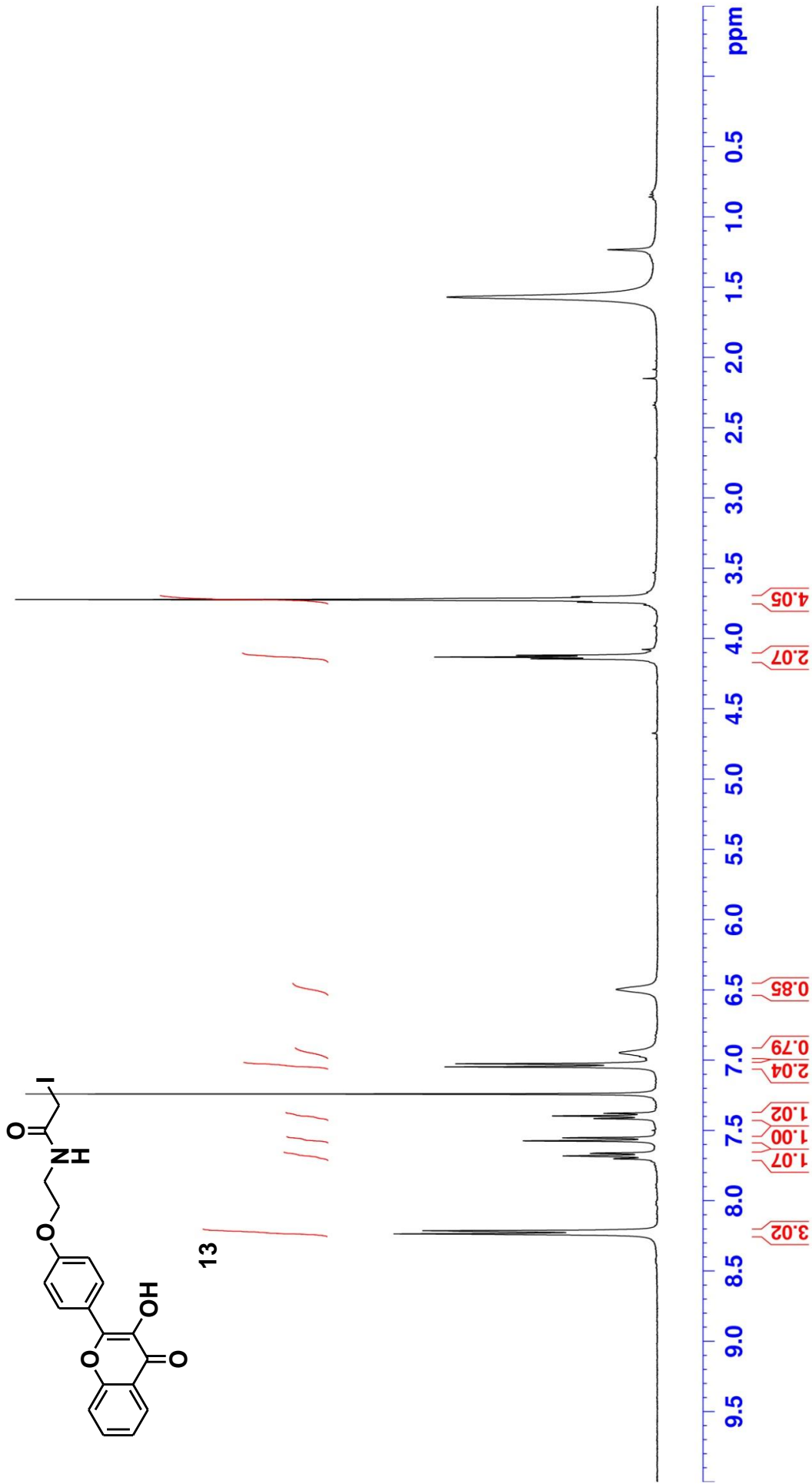
HPJ-20160425-022-mix column run2-CDCI3

8.24
8.21
7.70
7.68
7.66
7.57
7.55
7.42
7.40
7.38
7.24
7.05
7.03
6.95
6.50

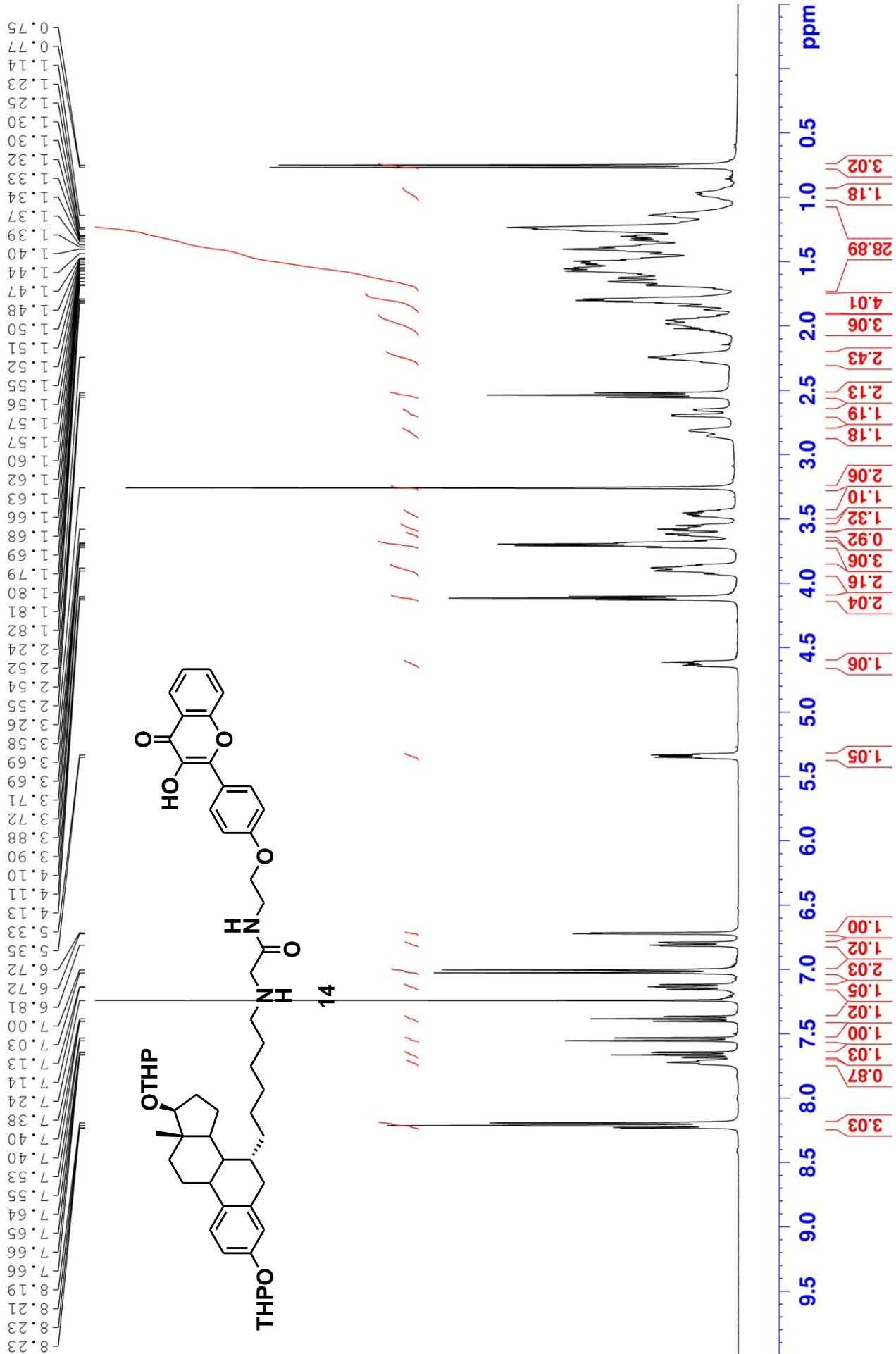
4.14
4.13
4.12
3.74
3.72
3.70



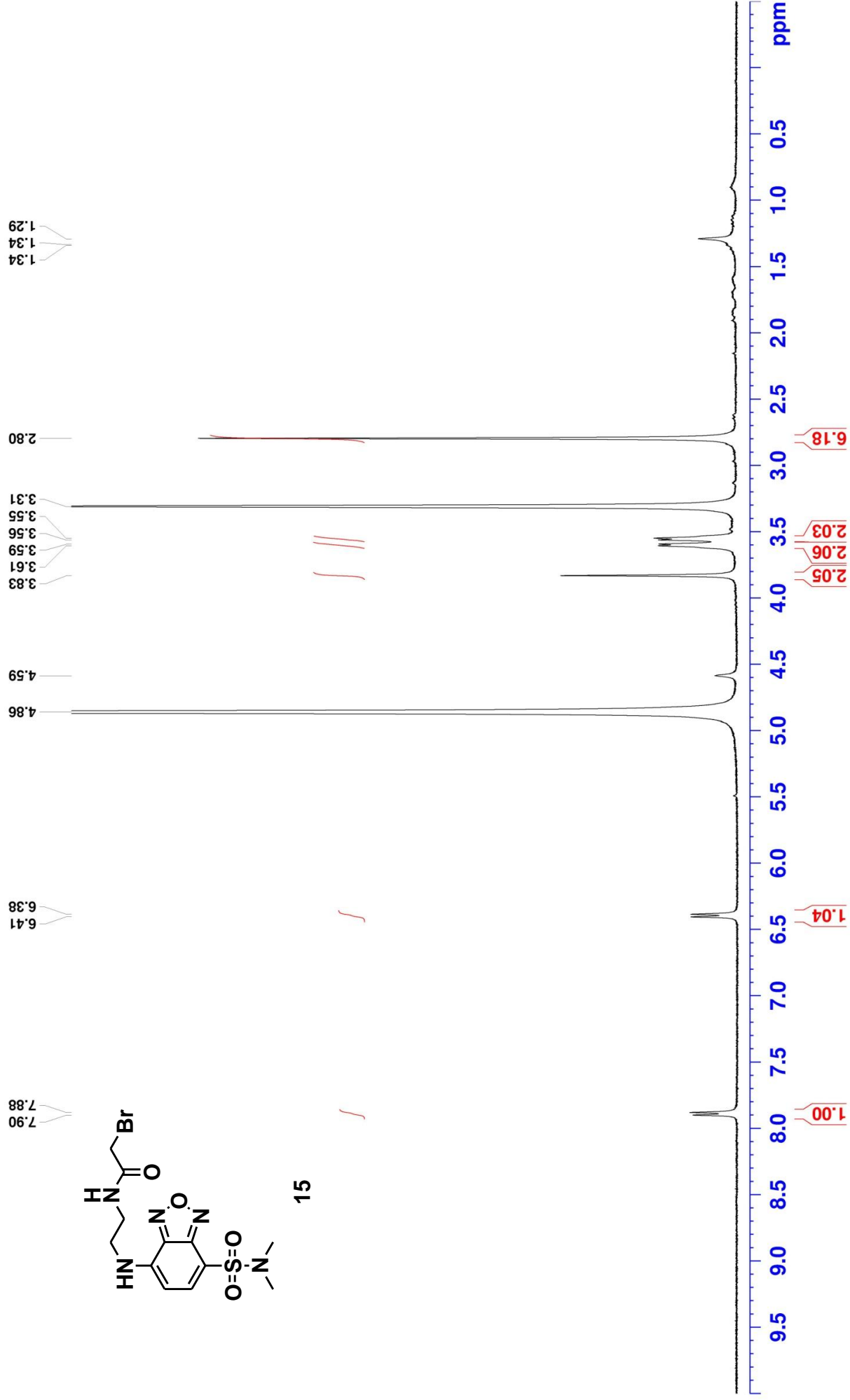
13



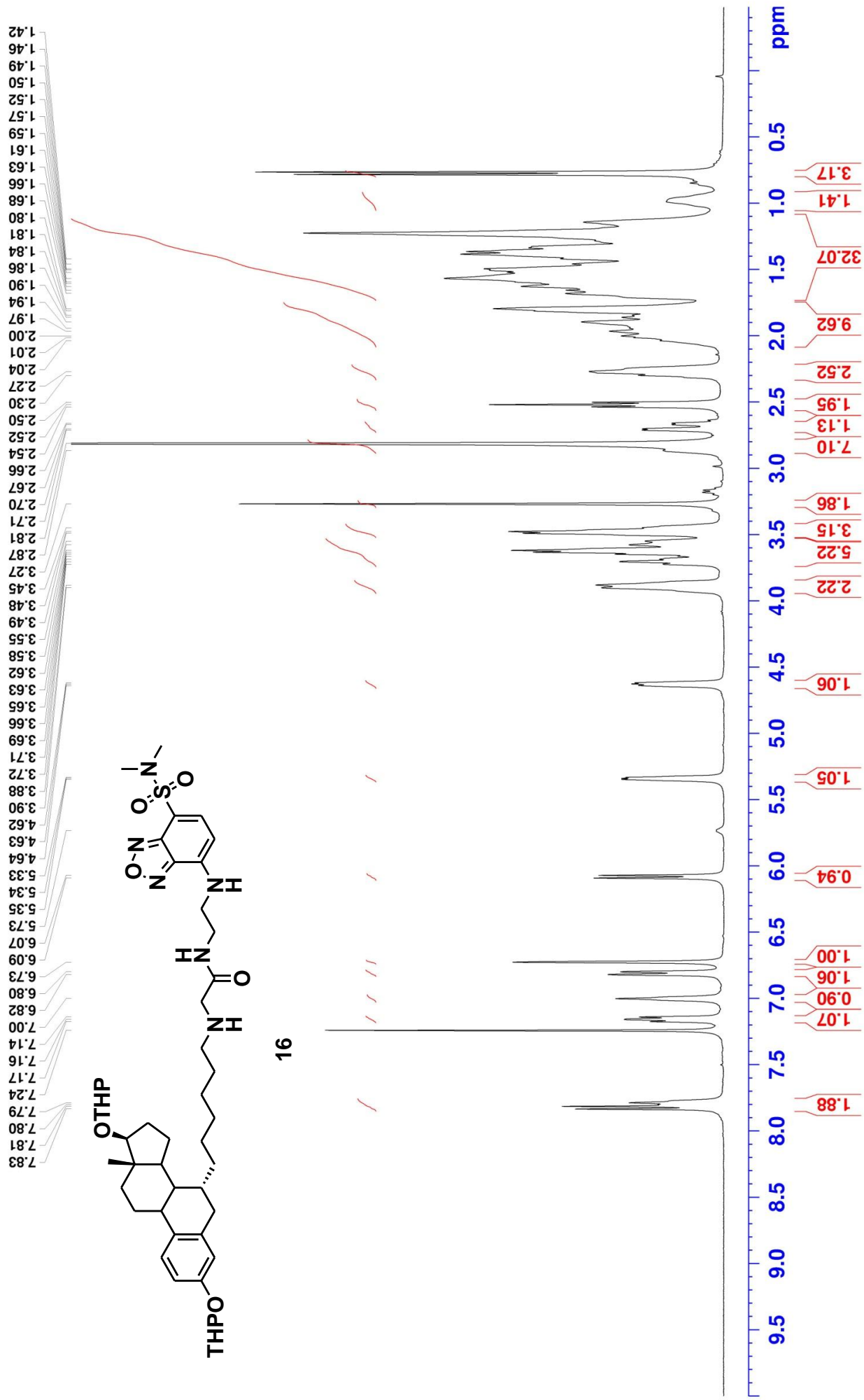
HPJ-20160519-027-P-CDCI3



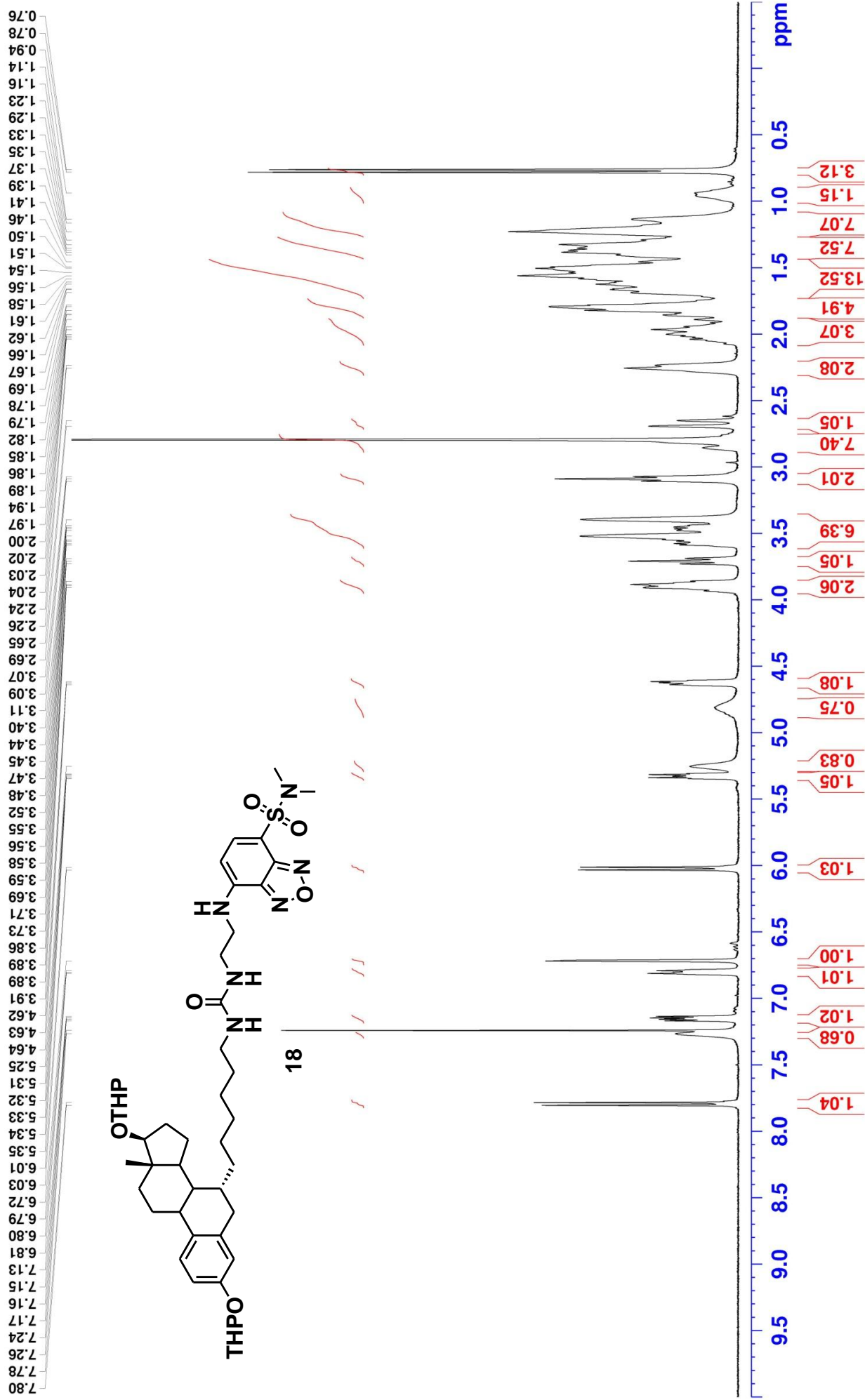
HPJ-20170222-B031-P-column-MeOD



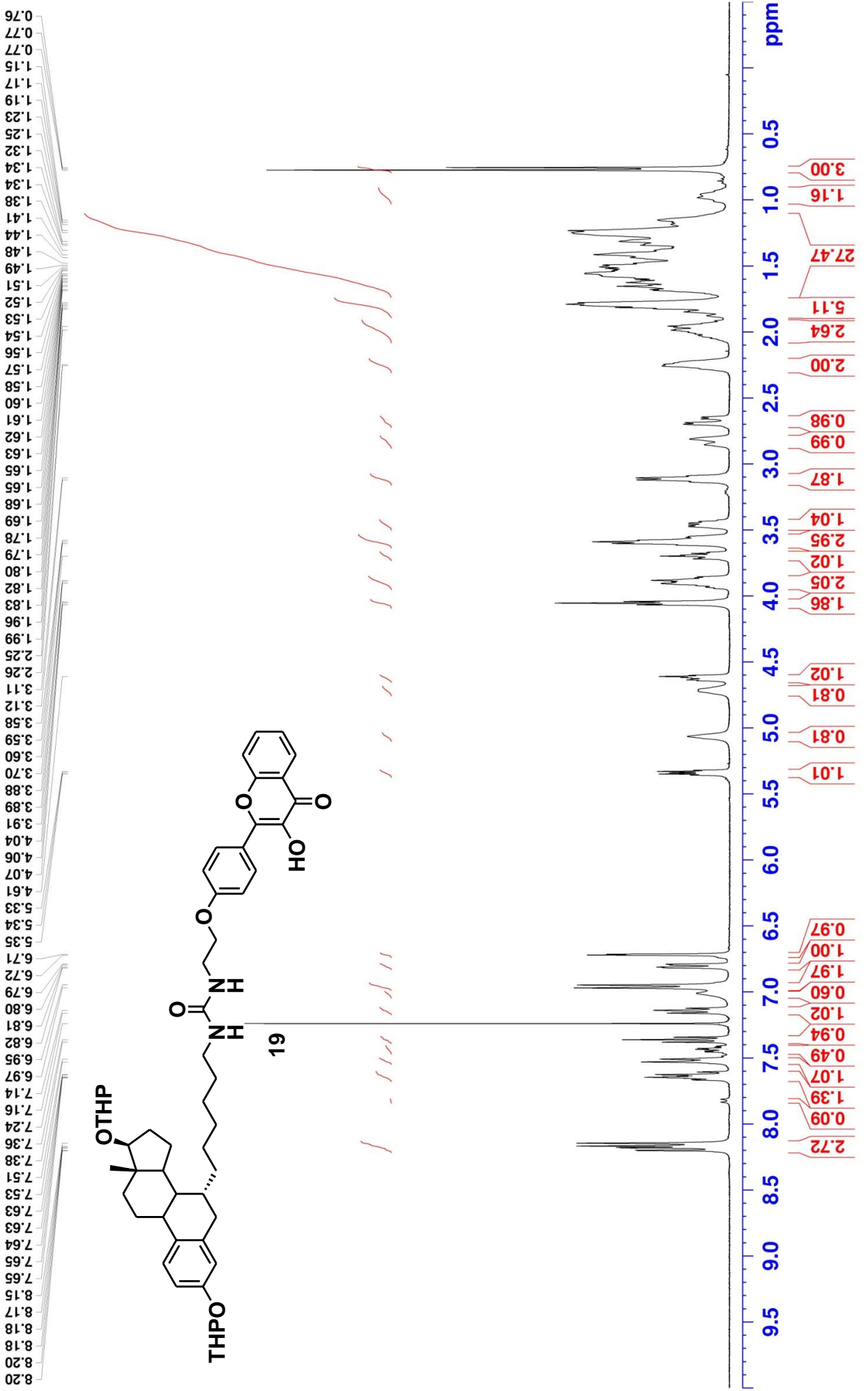
HPJ-20170301-B032-P-mono NBD-CDCI3



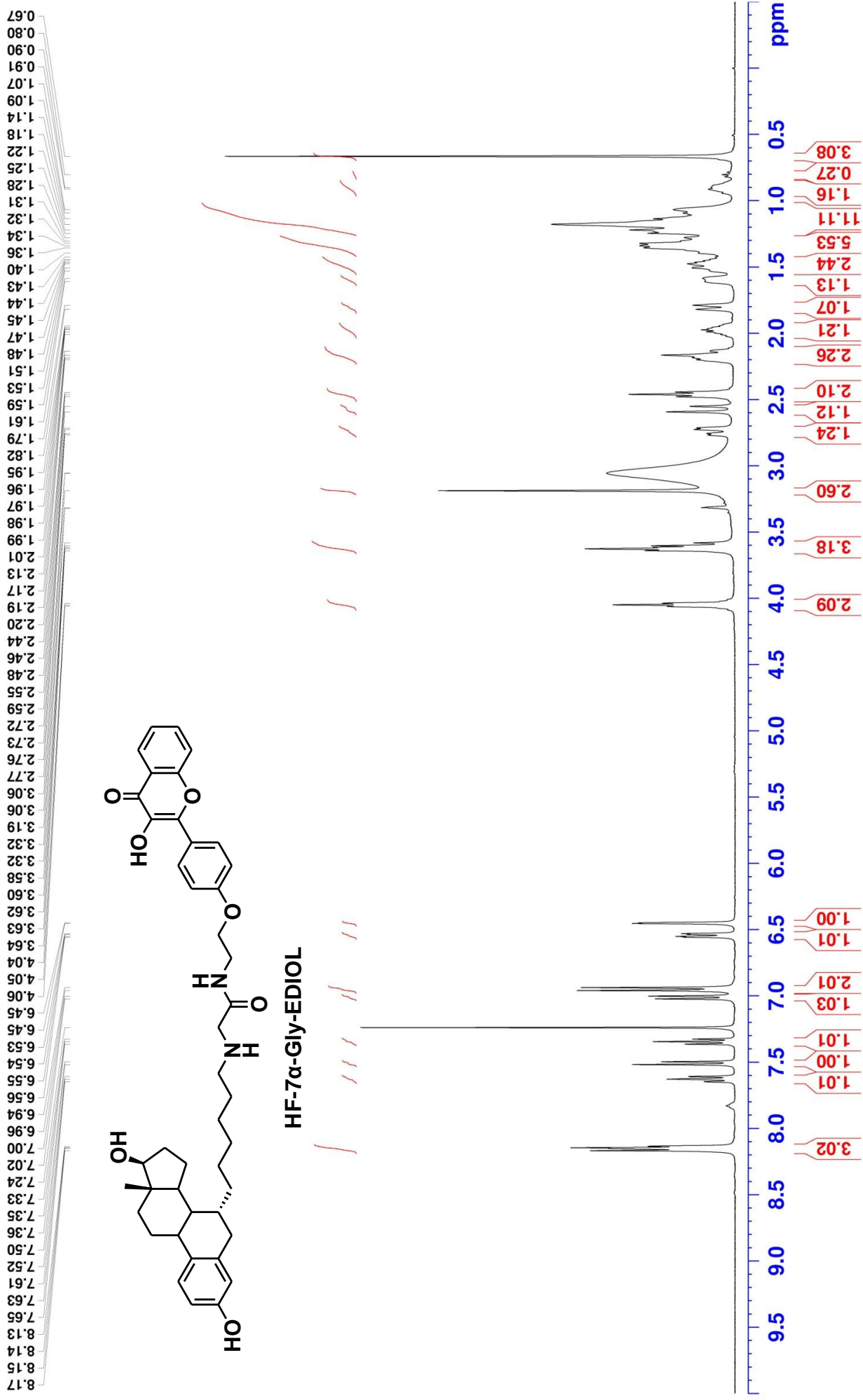
HPJ-20170420-B055-P-again-CDCI3



HPJ-20170421-B057-P-CDCI3

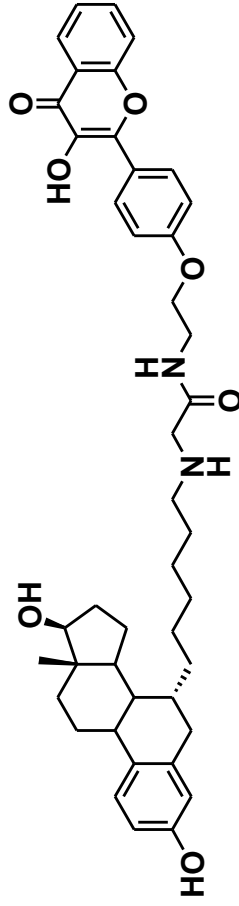


HPJ-20170310-B024-P-recheck-CDCl3+3 drops of MeOH



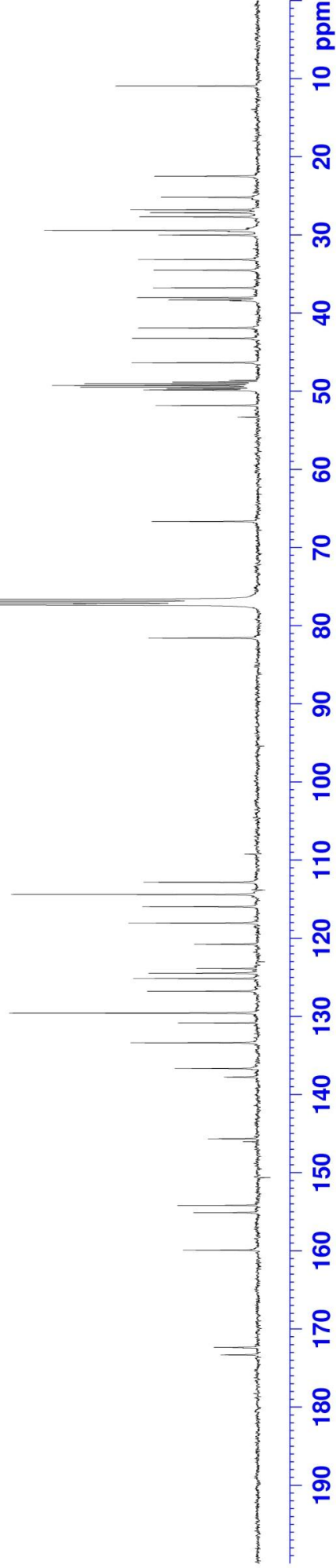
HPJ-20170906-HF-G-C spectra-CDCI3+3 drops of MeOH

173.30
172.35
159.90
155.11
154.20
146.03
145.67
137.77
136.68
133.39
130.85
129.58
126.79
125.17
124.48
123.89
120.77
118.06
115.98
114.41
112.84
109.23

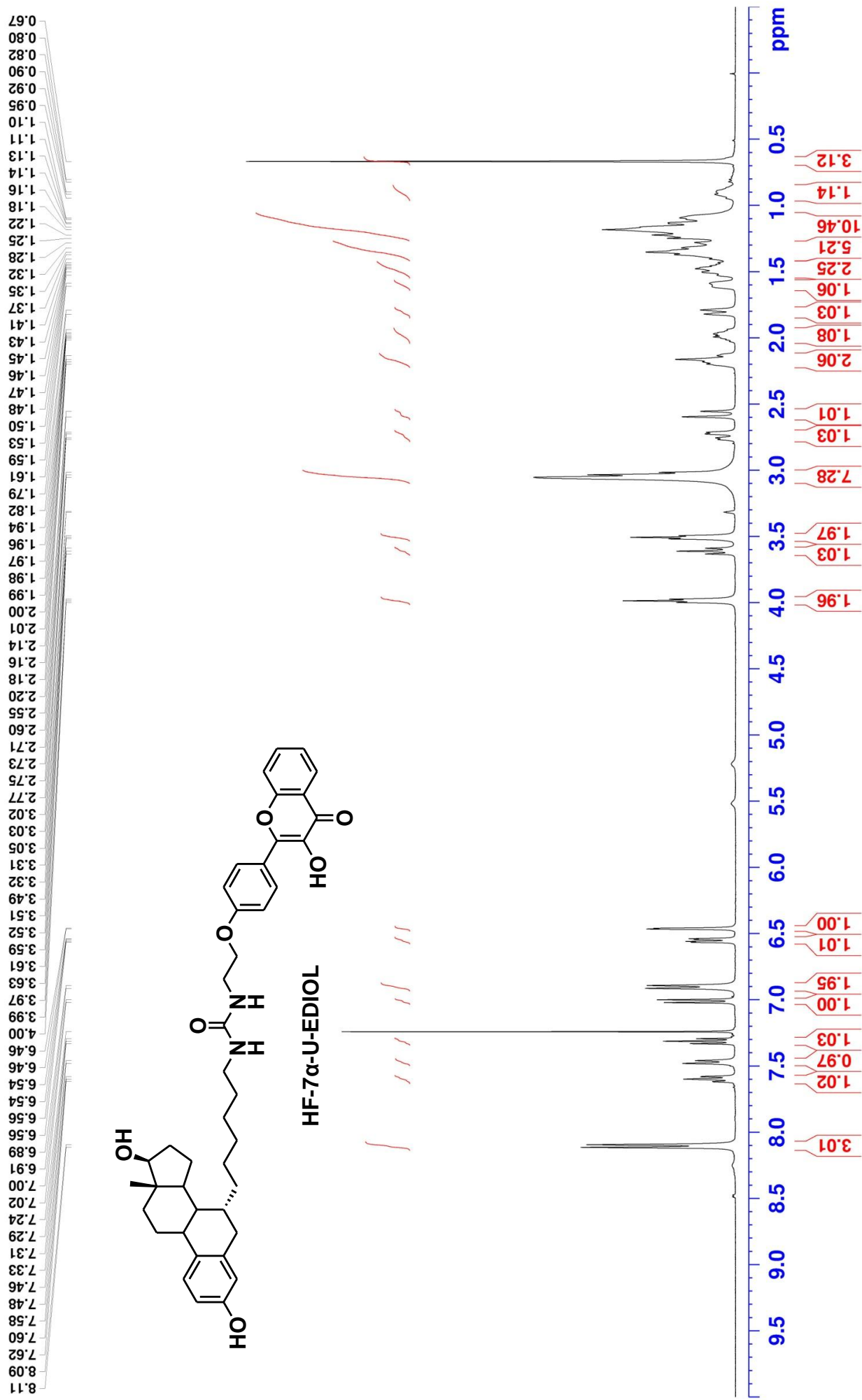


HF-7 α -Gly-EDIOL

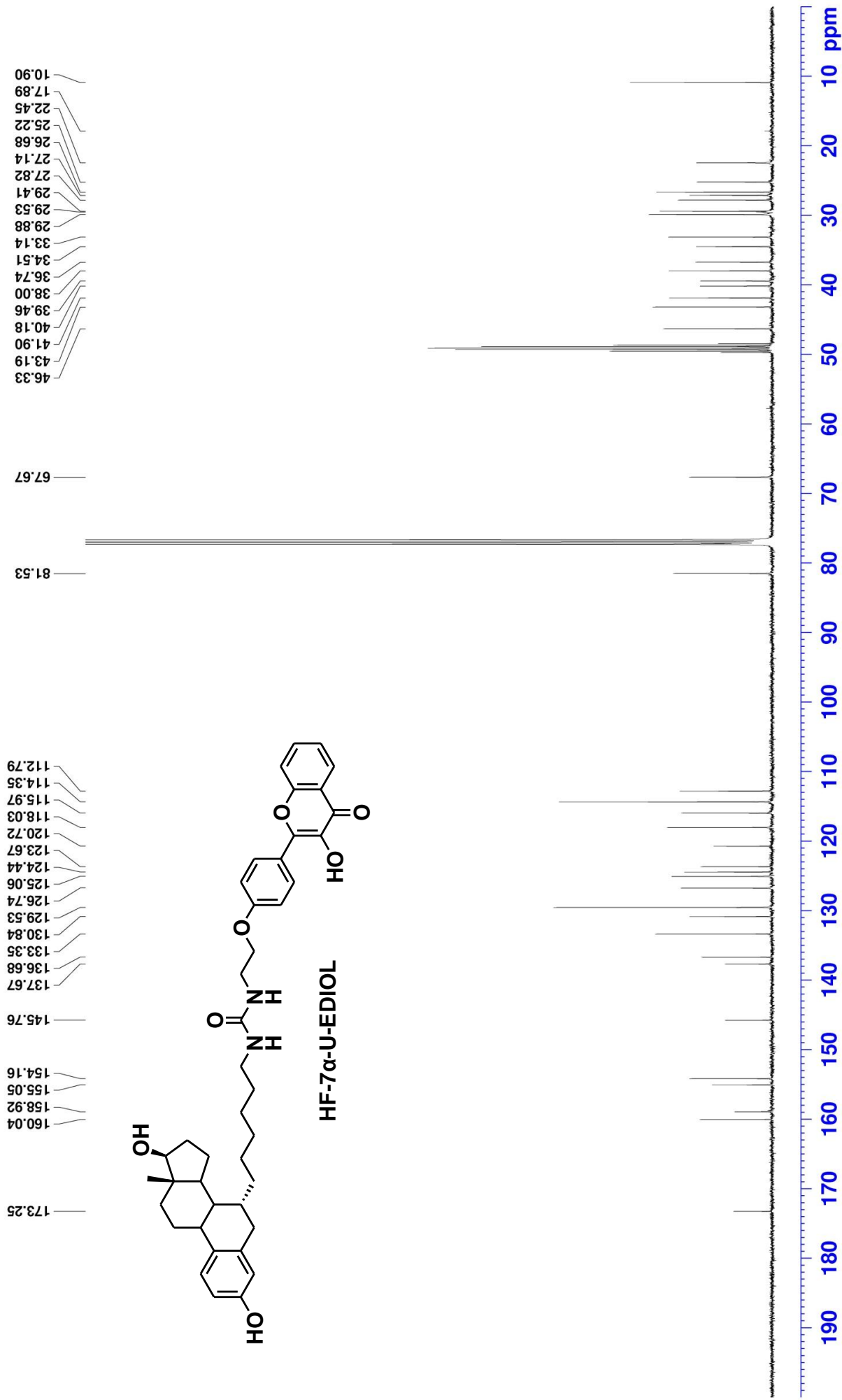
81.59
77.32
77.20
77.00
76.68
66.67
53.34
51.83
49.84
49.69
49.48
49.26
49.05
48.83
48.62
46.36
43.23
41.91
38.43
38.32
38.04
36.77
34.52
33.16
30.02
29.44
27.69
27.16
26.78
25.19
22.48
13.95
10.93



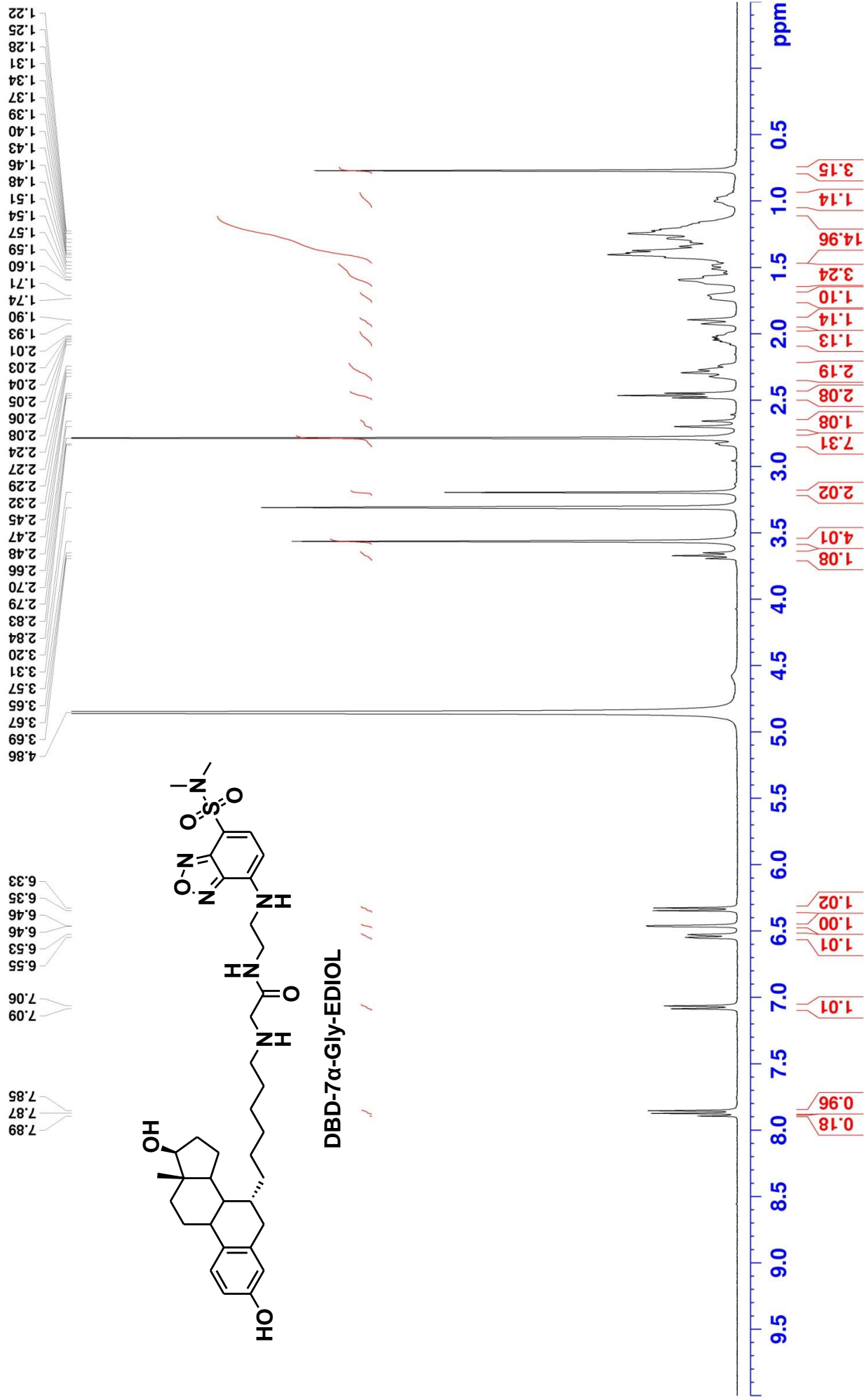
HPJ-20170423-B059-P-CDCI3+10 drops of MeOH



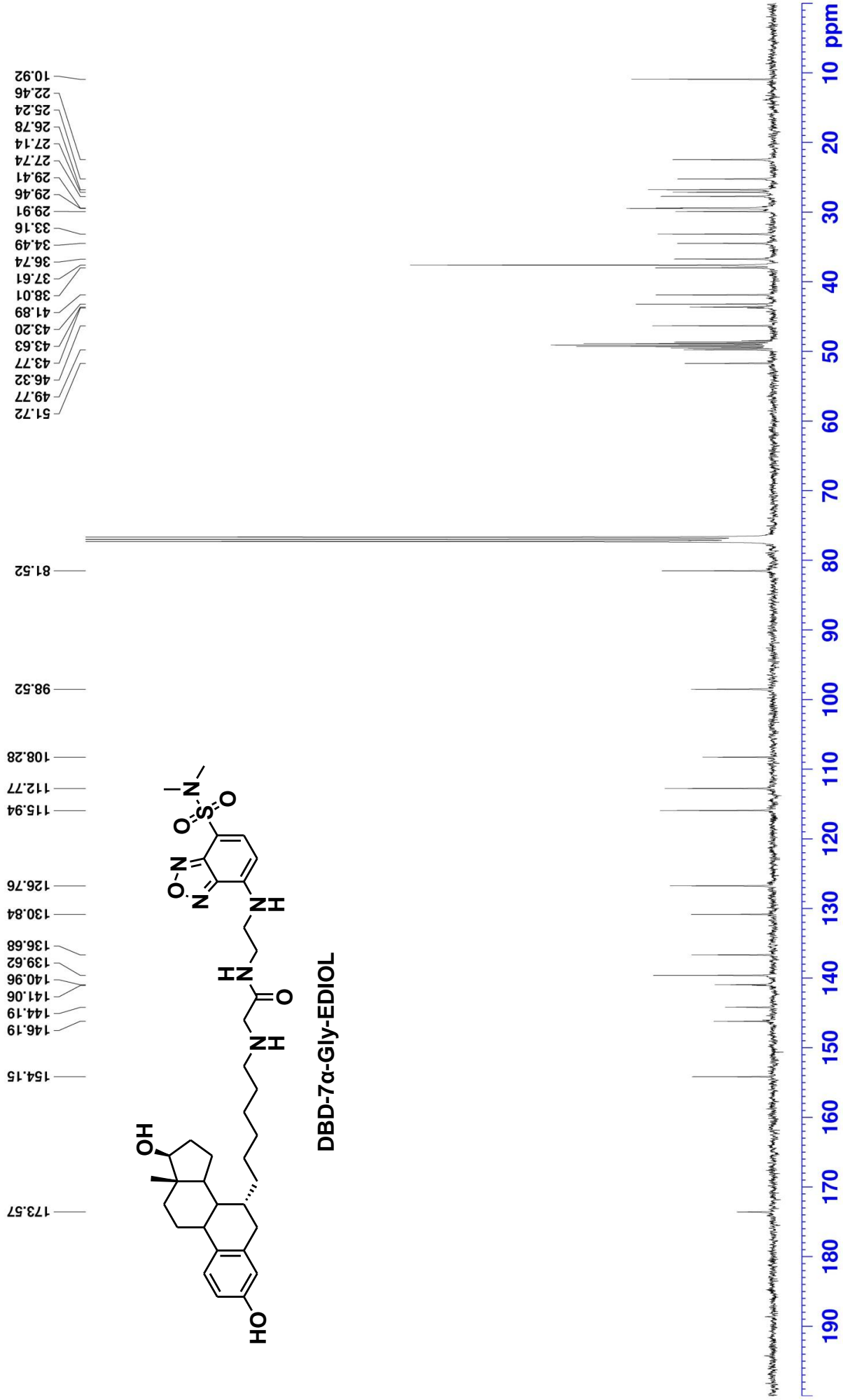
HPJ-20170907-(HF-U)-C spectra-CDCI3+trace MeOD



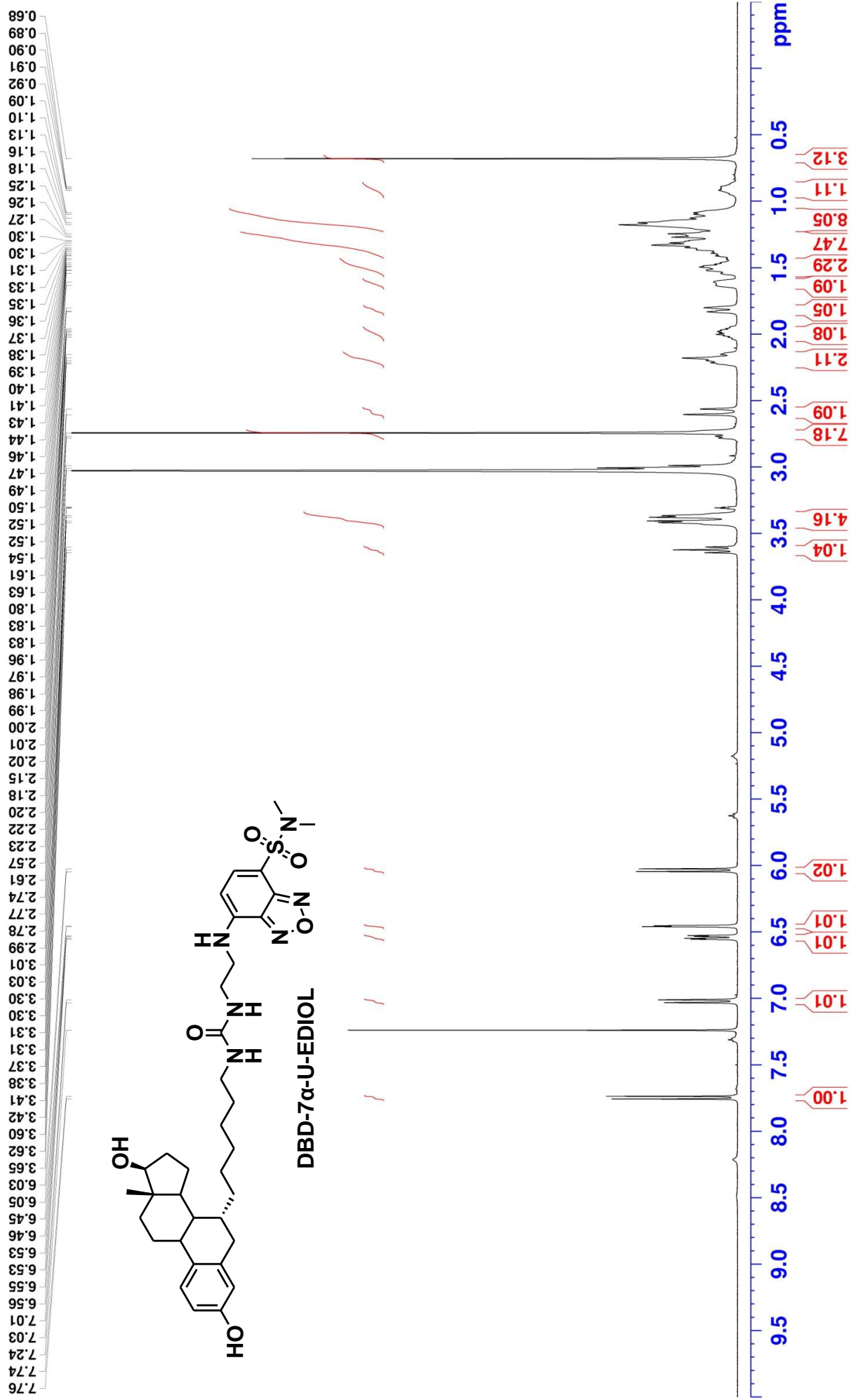
HPJ-20170304-B036-column again-P-MeOD



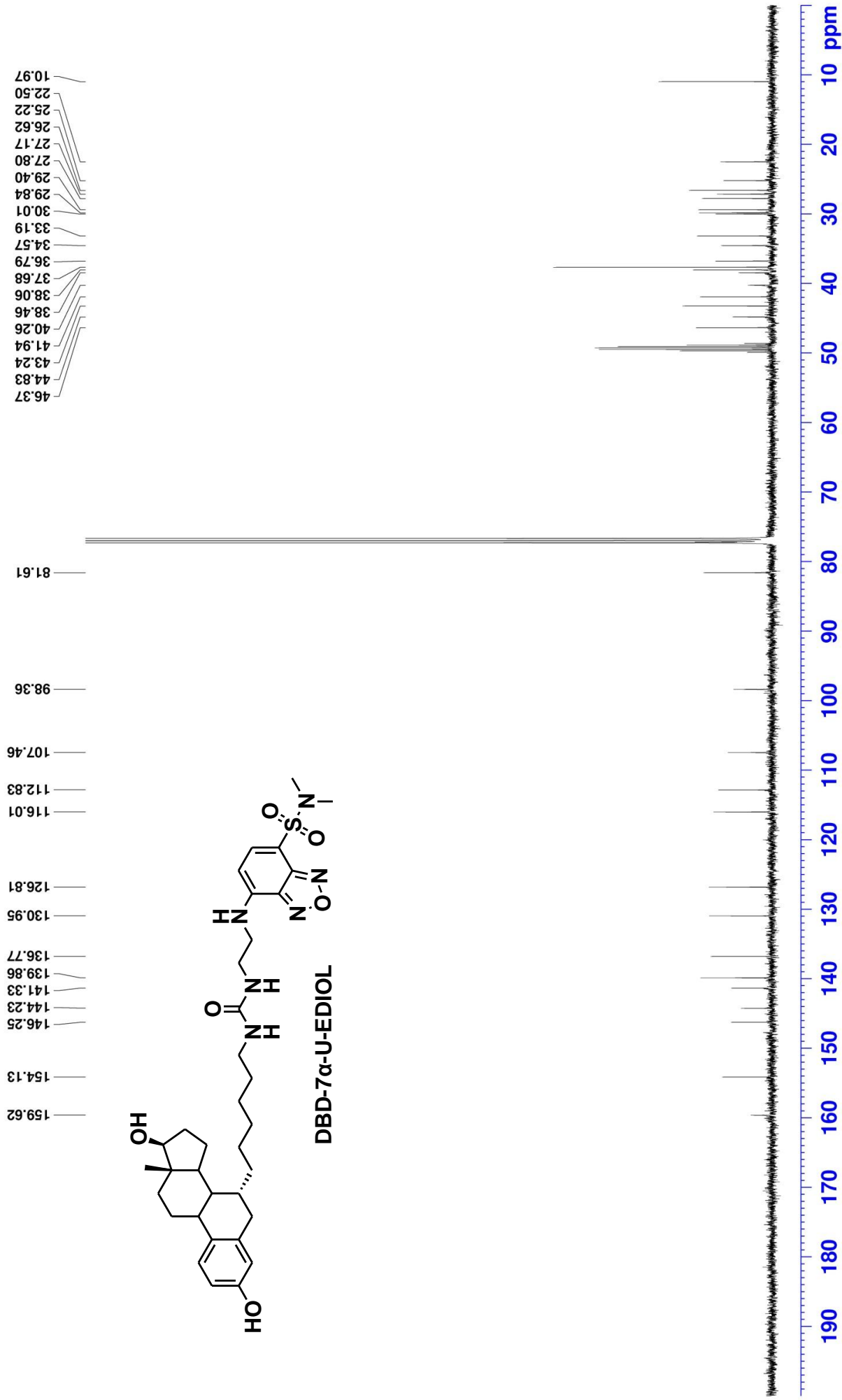
HPJ-20170907-(DBD-G)-C spectra-CDCl3+trace MeOD



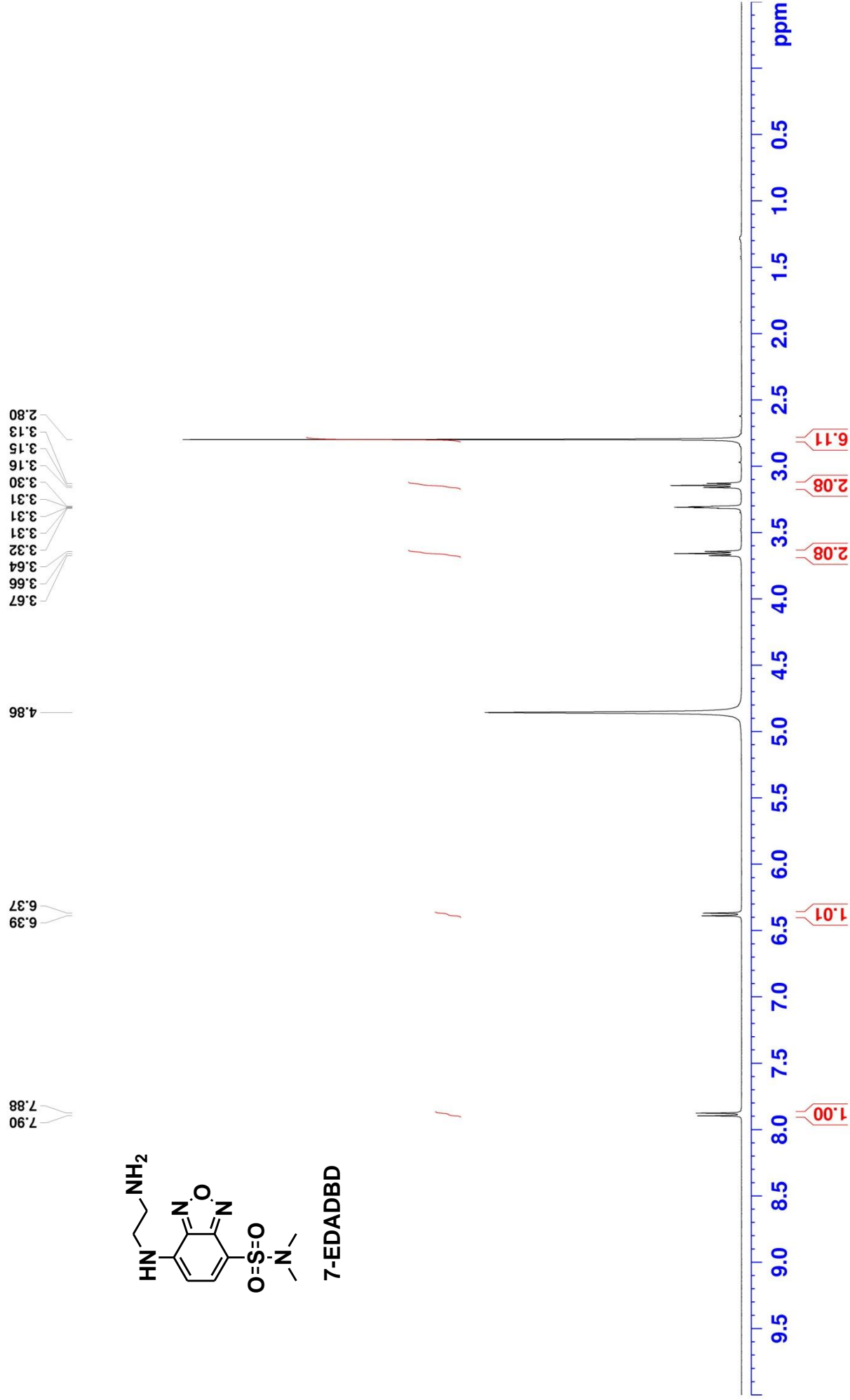
HPJ-20170421-B057-P-CDCI3+5 drops of MeOH



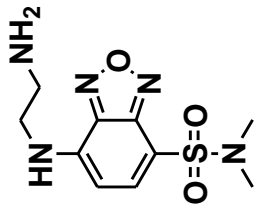
HPJ-20170907-(DBD-U)-C spectra-CDCI3+trace MeOD



HPJ-20170220-B030-p(point3)-MeOD+trace CDCl3



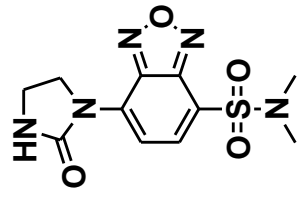
HPJ-20170907-(7-EDADBD)-C spectra-DMSO



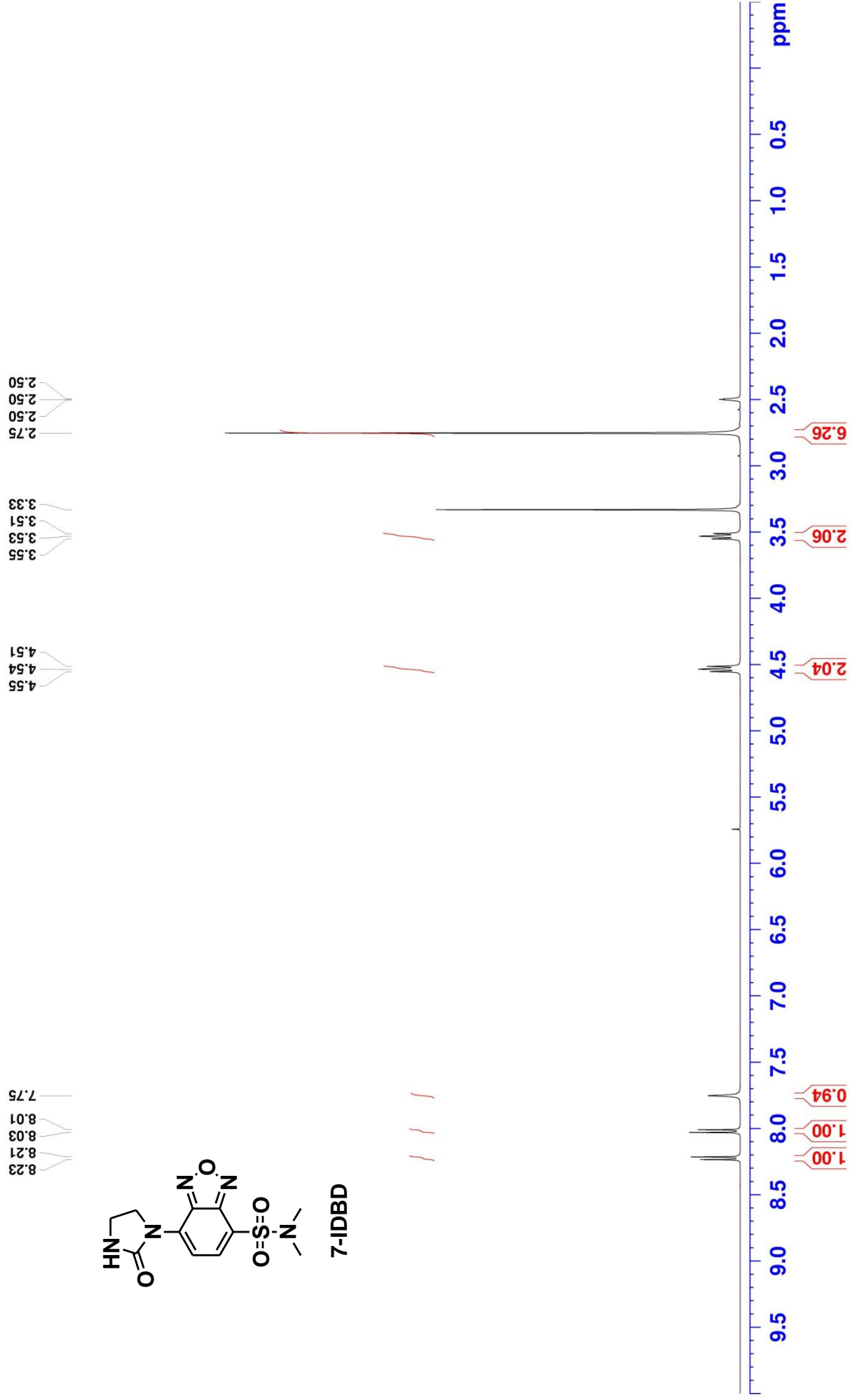
7-EDADBD



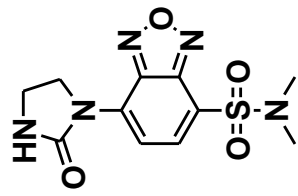
HPJ-20170429-B060-crude solid part-DMSO



7-IDBD



HPJ-20170429-B060-crude solid part-DMSO



7-IDBD

