



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การสังเคราะห์คอนจูเกตเดนดริเมอร์เรืองแสงเพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัด”
(Synthesis of Fluorescent Conjugate Dendrimers for Sensing Applications)

โดย

อาจารย์ ดร. ไพฑูรย์ รัชตะสาคร

30 มิถุนายน 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การสังเคราะห์คอนจูเกตเดนทริเมอร์เรืองแสงเพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัด”
(Synthesis of Fluorescent Conjugate Dendrimers for Sensing Applications)

ผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. ไพฑูรย์ รัชตะสาคร

หน่วยวิจัยเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ: MRG5080197

ชื่อโครงการ: การสังเคราะห์คอนจุกต์เดนดริเมอร์เรืองแสงเพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัด

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: อาจารย์ ดร. ไพฑูรย์ รัชตะสาคร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : paitoon.r@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (2 กรกฎาคม 2550 ถึง 01 กรกฎาคม 2552)

บทคัดย่อ:

โพลีอิลเลกโทรไลต์เรืองแสงแบบเดนดริเมอร์ที่มีส่วนของฟีนิลีนเอไธนีนกลุ่มหนึ่งได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อนำไปใช้เป็นสารส่งสัญญาณการตรวจวัดที่ละลายน้ำได้ ปฏิริยาหลักที่ใช้ได้แก่การแทนที่ด้วยหมู่ไอโอไดด์บนไตรฟีนิลเอมีนแบบมีการเลือกตำแหน่งและปฏิกิริยาควบคู่โซโนกาซิริกับสารที่มีหมู่เทอร์มินัลอะเซทิลีน หลังจากทำการติดหมู่ปลายที่ชอบน้ำแล้วจะทำให้โมเลกุลที่ได้สามารถละลายน้ำได้และให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ดีด้วย เดนดริเมอร์ชั้นที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยฟีนิลีนเอไธนีน 9 หน่วย และมีหมู่คาร์บอกซิเลตเป็นหมู่ปลาย 6 หมู่ สามารถแสดงการยับยั้งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ด้วยไอออนของปรอทโดยมีค่าคงที่ สเตอร์น-โวลเมอร์เท่ากับ $33,000 \text{ M}^{-1}$ ในตัวกลางที่เป็นน้ำซึ่งมี ทรिटัน เอ็กซ์-100 เป็นเซอร์แฟกแทนท์ ส่วนเดนดริเมอร์ชั้นที่ 0 ที่มีประจุบวกแสดงการตอบสนองด้วยสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่น่าสนใจต่อเซอร์แฟกแทนท์, ดีเอ็นเอ, โปแทสเซียม โพลีไวนิลซัลเฟต, และโบวีน ซีรัม อัลบูมิน

คำหลัก : เดนดริเมอร์, ฟลูออเรสเซนส์, เซนเซอร์

Project Code : MRG5080197

Project Title : Synthesis of Conjugate Fluorescent Dendrimers for Sensing Applications

Investigator : Dr. Paitoon Rashatasakhon

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

E-mail Address : paitoon.r@chula.ac.th

Project Period : 2 years (2 July 2007 to 1 July 2009)

Abstract:

A series of fluorescent dendritic phenylene ethynylene polyelectrolytes have been synthesized with an aim of application as water-soluble sensor probes. The key reactions include a regioselective iodination of triphenyl amine and Sonogashira cross-coupling with terminal acetylenic compounds. After the installation of hydrophilic peripheral groups, the resulting macromolecules exhibit good water-solubility as well as fluorescent signal. The first generation fluorescent dendrimer containing nine phenylene ethynylene units and six carboxylate peripheral groups exhibits a highly selective fluorescence quenching by Hg^{2+} ions. The Stern-Volmer constant (K_{SV}) is $33,700 \text{ M}^{-1}$ in aqueous media in the presence of Triton X-100 surfactant. The zeroth generation polycationic analog exhibits interesting fluorogenic responses to various types of surfactants, DNA, potassium poly(vinyl) sulfate (PVSK) and bovine serum albumin (BSA).

Keywords : Dendrimer, Fluorescence, Sensor

Executive Summary

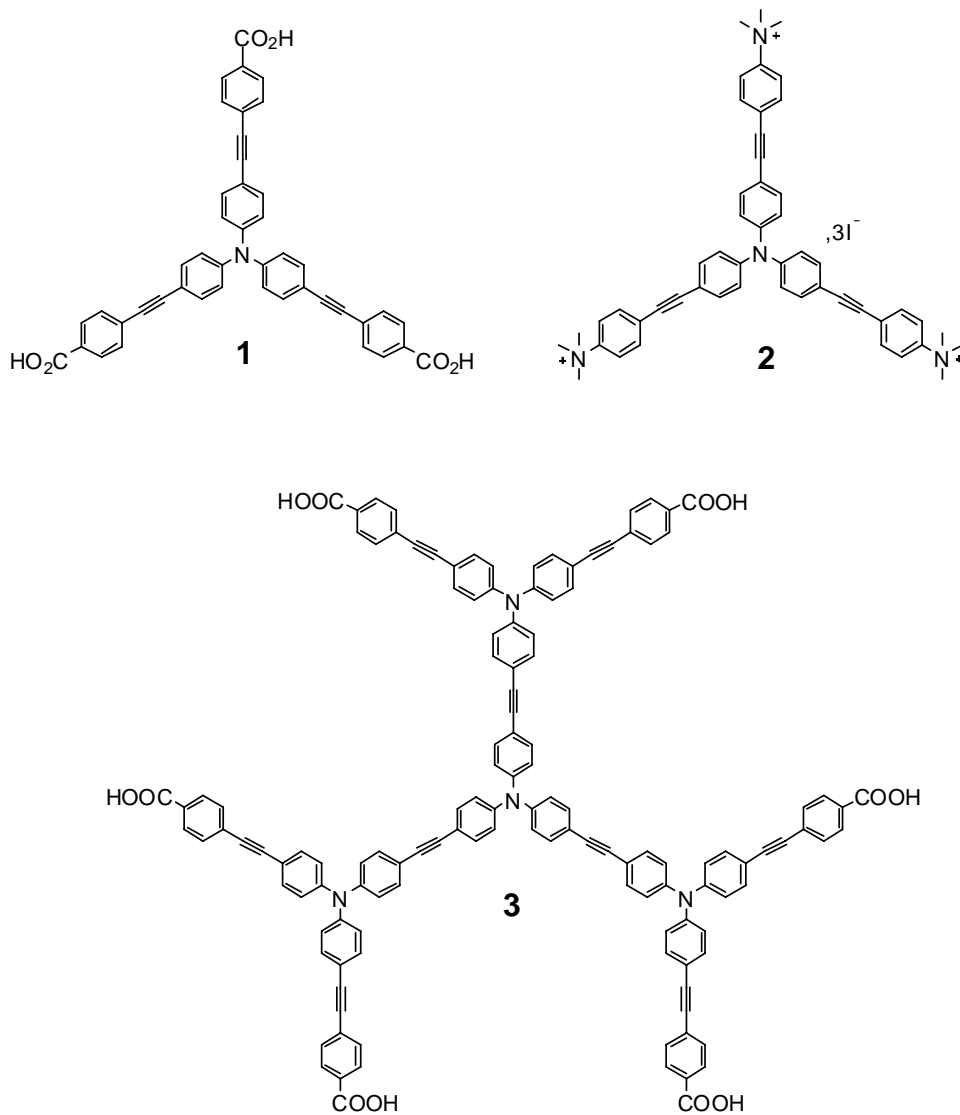
โครงการวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์โพลีอิเล็กโทรไลต์เรืองแสงแบบเดนดริเมอร์ที่ละลายน้ำได้ ทั้งหมด 3 ชนิด โดยโครงสร้างของสารทุกตัวจะมีส่วนของฟีนิลีนเอไธนีนเป็นหน่วยซ้ำ และมีหมู่ไตรฟีนิลเอมีนเป็นแกนกลาง ปฏิริยาหลักที่ใช้ได้แก่การแทนที่ด้วยหมู่ไฮโดรเจนไตรฟีนิลเอมีนแบบมีการเลือกตำแหน่ง และปฏิกิริยาควบคู่แบบไซโนการิกับสารที่มีหมู่เทอร์มินัลอะเซทิลีน หลังจากทำการติดหมู่ปลายที่ชอบน้ำแล้วจะทำให้หโมเลกุลที่ได้สามารถละลายน้ำได้และให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ดีด้วย เดนดริเมอร์ชั้นที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยฟีนิลีนเอไธนีน 9 หน่วย และมีหมู่คาร์บอกซิเลตเป็นหมู่ปลาย 6 หมู่ สามารถแสดงการยับยั้งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ด้วยไอออนของปรอทโดยมีค่าคงที่ สเตอร์น-โวลเมอร์ เท่ากับ $33,000 \text{ M}^{-1}$ ในตัวกลางที่เป็นน้ำซึ่งมี ทรันเอ็กซ์-100 เป็นเซอร์แฟกแทนท์ ส่วนเดนดริเมอร์ชั้นที่ 0 ที่มีประจุบวกแสดงการตอบสนองด้วยสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่น่าสนใจต่อเซอร์แฟกแทนท์, ดีเอ็นเอ, โฟแทสเซียม โพลีไวนิลซัลเฟต, และโบวิน ซีรัม อัลบูมิน โดยลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัญญาณจะขึ้นอยู่กับลักษณะทางโครงสร้างของสาร

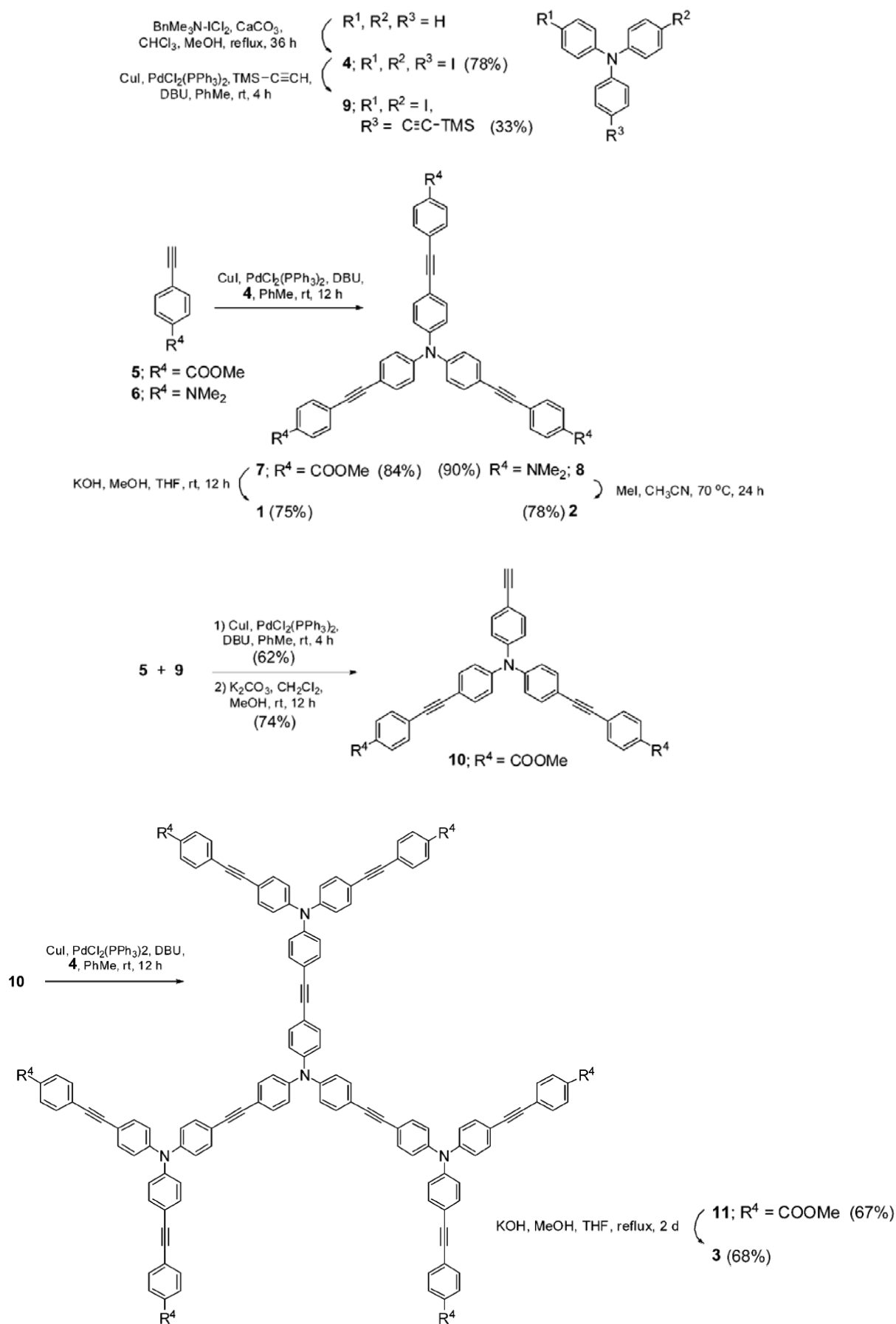
วัตถุประสงค์

1. เพื่อออกแบบและสังเคราะห์คอนจูเกตเดนทริเมอร์เรืองแสงที่ละลายน้ำได้
2. เพื่อศึกษาสมบัติฟลูออเรสเซนซ์ของสารที่สังเคราะห์ได้
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนหรือสารที่มีประจุตรงข้าม

วิธีทดลอง

คอนจูเกตเดนทริเมอร์เรืองแสงที่ละลายน้ำได้ (1-3) สามารถสังเคราะห์ได้ตามขั้นตอนการสังเคราะห์ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 ตามวิธีการต่อไปนี้





แผนภาพที่ 1 กระบวนการสังเคราะห์สาร 1-3

Synthesis Procedures

4, 4', 4''-triiodotriphenylamine (TI₃). A mixture of 10 (7.36 g, 30 mmol) in chloroform (100 mL) and methanol (50 mL) was added BTMAICl₂ (34.47 g, 99 mmol) and CaCO₃ (18 g, 0.18 mol). The reaction mixture was allowed to reflux for 72 h., 20% Na₂S₂O₃ solution was added to the mixture until the mixture became light yellow. The mixture was filtered and the filtrate was separated. The aqueous layer was extracted with methylene chloride (3 x 50 mL). The combined organic layer was washed with water (2 x 100 mL) and dried over anhydrous MgSO₄. The mixture was concentrated and the residue was reprecipitated in methanol from methylene chloride solution. Compound 11 was obtained (14.59 g, 78%) as a white solid: mp ; 182-184°C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.53 (d, J = 7.5 Hz, 6H), 6.80 (d, J = 7.5 Hz, 6H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 146.6, 138.5, 126.1, 88.7; MALDI-TOF m/z Calcd: 622.81 Found: 622.561.

Monomers. A mixture of TI₃ (2.0 g, 3.2 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (11 mg, 0.16 mmol), CuI (3.0 mg, 0.16 mmol), trimethylsilyl acetylene (0.34 g, 3.5 mmol) in toluene (10 ml) was added DBU (1 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. After the mixture was filtered and the solid washed with toluene (3x15 ml). The combined filtrate was evaporated and the residue was eluted through a silica gel column by hexane to **monomers** as a light yellow oil (0.57 g, 33% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.53 (d, J = 6.8 Hz, 4H), 7.33 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.94 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 6.8 Hz, 4H), 0.23 (s, 9H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 146.5, 138.4, 133.2, 126.3, 123.1, 117.5, 140.6, 93.9, 86.7, 0.01; MALDI-TOF m/z Calcd for 592.95 Found: 593.247.

4-iodo-N,N-dimethylaniline. A mixture of N,N-dimethylaniline (6.0 g, 50 mmol) in chloroform (100 mL) and methanol (50 mL) was added BTMAICl₂ (18.08 g, 52 mmol) and CaCO₃ (16.45 g, 0.15 mmol). The reaction mixture was allowed to reflux for 36 h, 20% Na₂S₂O₃ solution was added to the mixture until the mixture became light yellow. The mixture was filtered and the filtrate was separated. The aqueous layer was extracted with methylene chloride (3 x 50 mL). The combined organic layer was washed with water (2 x 100 mL) and dried over anhydrous MgSO₄. The mixture was concentrated and the residue was reprecipitated in methanol from methylene chloride solution. Compound 4-iodo-N,N-dimethylaniline was obtained (10.37 g, 84%) as a purple solid: mp ; 91-93°C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.46 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 6.49 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.92 (s, 6 H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 137.5, 114.7, 40.4; MS-ES⁺ m/z Calcd: 246.99 Found.

N, N-dimethyl-4-((trimethylsilyl)ethynyl)aniline. A mixture of 4-iodo-N,N-dimethylaniline (2.51 g, 10 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (35 mg, 0.5 mmol), CuI (8 mg, 0.5 mmol) and trimethylsilylacetylene (1.08 g, 11 mmol) in toluene (10 ml) was added DBU (1 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. After the combined was filtered and the solid washed with toluene (3x15 ml). The combined filtrate was evaporated and the residue was eluted through a silica gel column by gradient solvents from pure hexane to methylene chloride/hexane (1/3) as an eluent to afford N, N-dimethyl-4-((trimethylsilyl)ethynyl)aniline as a yellow solid (2.17 g, 82% yield). mp: 88-89°C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.11(d, J = 7.2 Hz, 2H), 6.35 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 2.72 (s, 6H), 0.01 (s, 9H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 149.9, 132.9, 111.3, 109.6, 106.3, 90.9, 39.9, 0.01;

Methyl 4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzoate. A mixture of methyl 4-iodobenzoate (2.00 g, 7.6 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0.27 g, 0.4 mmol), CuI (0.07g, 0.38 mmol) and trimethylsilylacetylene (0.83 g, 8.4 mmol) in toluene (10 ml) was added DBU (1 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. After the combined was filtered and the solid washed with toluene (3 x 15 ml). The combined filtrate was evaporated and the residue was eluted through a silica gel column by gradient solvents from pure hexane to methylene chloride/hexane (1/4) as an eluent to afford methyl 4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzoate as a white solid (1.45 g, 82% yield). mp: 108-110°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.99 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 0.23 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 166.7, 132.0, 129.8, 129.5, 127.9, 104.2, 97.9, 52.4, 0.01; MALDI-TOF m/z Calcd: 232.09 Found: 233.425.

4-ethynyl-N,N-dimethylaniline. A mixture of N, N-dimethyl-4-((trimethylsilyl)ethynyl)aniline (1.00 g, 4.6 mmol) and K_2CO_3 (0.059 g, 0.43 mmol) in methylene chloride (15 mL) and methanol (15 mL) was stirred at room temperature for 12 h. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with methylene chloride (2 x 50 mL) and was then dried over anhydrous MgSO_4 . The combined filtrate was evaporated and the residue was eluted through a silica gel column by gradient solvents from pure hexane to methylene chloride/hexane (1/3) as an eluent to afford 4-ethynyl-N,N-dimethylaniline as a brown-yellow solid (0.60 g, 90 % yield). mp: 67-69°C. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.37 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.62 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 2.07 (s, 7H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ ; 150.4, 133.2, 111.7, 108.7, 84.9, 74.9, 40.

Methyl 4-ethynylbenzoate. A mixture of methyl 4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzoate (1.00 g, 4.3 mmol) and K_2CO_3 (0.059 g, 0.43 mmol) in methylene chloride (15 mL) and methanol (15 mL) was stirred at room temperature for 24 h. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with methylene chloride (2 x 50 mL) and was then dried over anhydrous MgSO_4 . The combined filtrate was evaporated and the residue was eluted through a silica gel column by gradient solvents from pure hexane to methylene chloride/hexane (1/4) as an eluent to afford Methyl 4-ethynylbenzoate as a white solid (0.60 g, 87% yield). mp:103-105°C. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.98 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 166.3, 132.0, 130.1, 129.4, 126.7, 82.8, 80.1, 52.2; °C; MS m/z Calcd: 160.05 Found: 161.035.

(5). A mixture of monomer (0.41 g, 0.69 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (28 mg, 0.07 mmol), CuI (13 mg, 0.07 mmol), Methyl 4-ethynylbenzoate (2.43 g, 1.52 mmol) in toluene (10 ml) was added DBU (1 ml) and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. After the combined filtrate was evaporated and the residue was eluted through a silica gel column by gradient solvents from pure hexane to methylene chloride/hexane (2/1) as an eluent to afford **5** as a yellow solid (0.28 g, 62% yield). mp: 120-122°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.02 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.57 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.44 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.39 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.06 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.93 (s, 6H), 0.23 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 0.01; MALDI-TOF m/z Calcd for 657.23 Found: 656.908.

Dendron. A mixture of **5** (0.20 g, 0.34 mmol) and K_2CO_3 (42 mg, 0.034 mmol) in methylene chloride (15 mL) and methanol (15 mL) was stirred at room temperature for 24 h. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with methylene chloride (2 x 50 mL) and was

then dried over anhydrous MgSO_4 . The combined filtrate was evaporated and the residue was eluted through a silica gel column by gradient solvents from pure hexane to methylene chloride/hexane (2/1) as an eluent to afford **dendron** as a yellow solid (0.15 g, 74% yield). mp: 193-195°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.01 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.57 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.44 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.41 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.93 (s, 6H), 0.23 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 166.6, 147.0, 138.4, 133.0, 129.5, 129.3, 128.1, 124.1, 124.0, 117.4, 117.1, 92.3, 88.7, 83.4, 52.2; MALDI-TOF m/z Calcd for 585.19 Found: 584.804.

Dendrimers (1) ester. A mixture of **TI₃** (0.30 g, 0.48 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (55 mg, 0.080 mmol), CuI (15 mg, 0.080 mmol), methyl 4-ethynylbenzoate (0.25 g, 1.6 mmol) in toluene (10 ml) was added DBU (1 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. After the combined filtrate was evaporated and the residue was eluted through a silica gel column by gradient solvents from pure hexane to methylene chloride/hexane (2/1) as an eluent to afford **dendrimers (1) ester** as a yellow solid (0.80 g, 75% yield). mp: 242-244°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.00 (d, J = 8.4 Hz, 6H), 7.56 (d, J = 8.4 Hz, 6H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 6H), 7.08 (d, J = 8.4 Hz, 6H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 166.5, 146.9, 133.0, 131.4, 129.5, 129.3, 128.0, 124.1, 117.5, 92.3, 88.7, 52.2; MALDI-TOF m/z Calcd: 719.03 Found: 719.802.

Dendrimers (2) amine. A mixture of **TI₃** (0.30 g, 0.48 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (55 mg, 0.080 mmol), CuI (15 mg, 0.080 mmol), 4-ethynyl-N,N-dimethylaniline (0.25 g, 1.6 mmol) in toluene (10 ml) was added DBU (1 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. After the combined filtrate was evaporated and the residue was eluted through a silica gel column by gradient solvents from pure hexane to methylene chloride/hexane (2/3) as an eluent to afford **Dendrimers (2) amine** as a yellow solid (0.25 g, 78% yield). mp: 284-286°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.39(d, J = 8.8 Hz, 6H), 7.38(d, J = 8.8 Hz, 6H), 7.04 (d, J = 8.8 Hz, 6H), 6.66 (d, J = 8.8 Hz, 6H), 2.99 (s, 18 Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ ; MALDI-TOF m/z Calcd: 674.34 Found: 674.845.

Compound 1. A mixture of **Dendrimers (1) ester** (0.50 g, 0.69 mmol) in THF (15 mL) and methanol (15 mL) was added saturated KOH aqueous solution (0.5 mL) and the mixture was stirred at room temperature. After 24 h the solution was evaporated and the residue dissolved in water (30 mL). Ice was added to the aqueous layer which is acidified and the mixture kept in refrigerator. The product was filtered to afford **1** as a yellow solid (0.34 g, 72% yield). mp: >350°C decompose; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 13.13(broad, 3H), 7.95 (d, J = 8.4 Hz, 6H), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 6H), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 6H), 7.10 (d, J = 8.4 Hz, 6H); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 100 MHz) δ 166.4, 146.7, 133.9, 131.8, 130.0, 126.4, 124.3, 117.4, 92.2, 88.7; MALDI-TOF m/z Anal. Calcd: 677.18 Found: 677.776.

Compound 2. A mixture of **Dendrimers (2) amine** (0.20 g, 0.69 mmol) in CH_3CN (15 mL) was added CH_3I (0.5 mL) and the mixture was stirred at 70 °C in seal tube. After 24 h the solution was evaporated to afford **2** as a yellow solid (0.34 g, 72% yield). mp:> 350 °C decompose; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 13.13(broad, 3H), 7.95 (d, J = 8.4 Hz, 6H), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 6H), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 6H), 7.10 (d, J = 8.4 Hz, 6H); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 100 MHz) δ 166.4, 146.7, 133.9, 131.8, 130.0, 126.4, 124.3, 117.4, 92.2, 88.7; MS-ES⁺ m/z Calcd: 719.87 Found: 240.004 $[\text{M}]^{3+}$.

Compound 4. A mixture of **TI**₃ (20 mg, 0.032 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (5 mg, 0.007 mmol), CuI (2 mg, 0.001 mmol), methyl 4-ethynylbenzoate (0.11 g, 0.18 mmol) in toluene (10 mL) was added DBU (0.1 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. After the combined filtrate was evaporated and the residue was eluted through a silica gel column by gradient solvents from pure hexane to methylene chloride/hexane (3/1) as an eluent to afford **4** as a yellow solid (83 mg, 64% yield). mp:198-200°C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.01 (d, J = 8.0 Hz, 12H), 7.56 (d, J = 8.0 Hz, 12H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 24H), 7.09 (d, J = 8.4 Hz, 24H), 3.93 (s, 18H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 166.6, 147.0, 146.6, 146.3, 133.0, 132.8, 132.7, 131.4, 129.5, 129.3, 128.1, 124.4, 124.0, 123.9, 118.5, 118.0, 117.3, 92.4, 89.1, 88.7, 52.2; MALDI-TOF m/z Calcd for 1996.21 Found: 1997.537.

Compound 3. A mixture of **4** (40 mg, 0.02 mmol), Saturated KOH aqueous solution (0.1 mL) in THF (10 mL), methanol (10 mL) and water (10 mL) was refluxed with stirring for 2 days. The solution was evaporated and the residue dissolved in water (15 mL). Ice was added to the aqueous layer which is acidified and the mixture kept in refrigerator. The product was filtered to afford **3** as a yellow solid (26 mg, 68% yield). mp: >350 °C decompose; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 7.92(d, J = 7.4 Hz, 12H), 7.59 (d, J = 7.4 Hz, 12H), 7.51-7.45 (m, 24 H) 7.02 (2, 24H); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, ppm) δ 167.1, 147.0, 146.5, 146.3, 133.5, 133.4, 133.1, 131.7, 130.8, 129.9, 127.1, 124.25, 118.0, 116.9, 92.4, 92.3, 89.5, 88.9; MALDI-TOF m/z Calcd for 1910.56 Found: 1911.515.

ผลการทดลอง

จากการศึกษาสมบัติทางแสง (Photophysical properties) ของสารสังเคราะห์ **1-3** พบว่ามีค่า absorbtion และ emission maxima wavelength, molar absorptivity และ quantum yield ดังสรุปในตารางที่ 1

Compound	Without Triton X-100			
	Absorption		Fluorescence	
	λ _{max} (nm)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ _{max} (nm)	Φ _F
1	374	5900	454	0.097
2	370	26823	485	0.14
3	375	63500	489	0.037
Compound	With Triton X-100			
	Absorption		Fluorescence	
	λ _{max} (nm)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ _{max} (nm)	Φ _F
1	383	9592	434	0.47
2	382	21310	438	0.46
3	379	49820	421	0.65

Table 1 Photophysical properties of **1-3** in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) without and with Triton X-100.

เนื่องจากสารสังเคราะห์ **1-3** มีทั้งส่วนของโมเลกุลที่ชอบและไม่ชอบน้ำ จึงอาจเกิดการจับตัวกันของสารเป็นอนุภาคเล็กๆ ที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าอันเกิดจาก hydrophobic interaction ซึ่งนำไปสู่สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ต่ำ ในการวิจัยนี้พบว่าการเติม surfactant เช่น Triton X-100 จะทำให้ได้สัญญาณที่สูงขึ้นดังแสดงใน Figure 1 ทั้งนี้เนื่องจาก surfactant สามารถลดการจับตัวกันของสารในน้ำได้

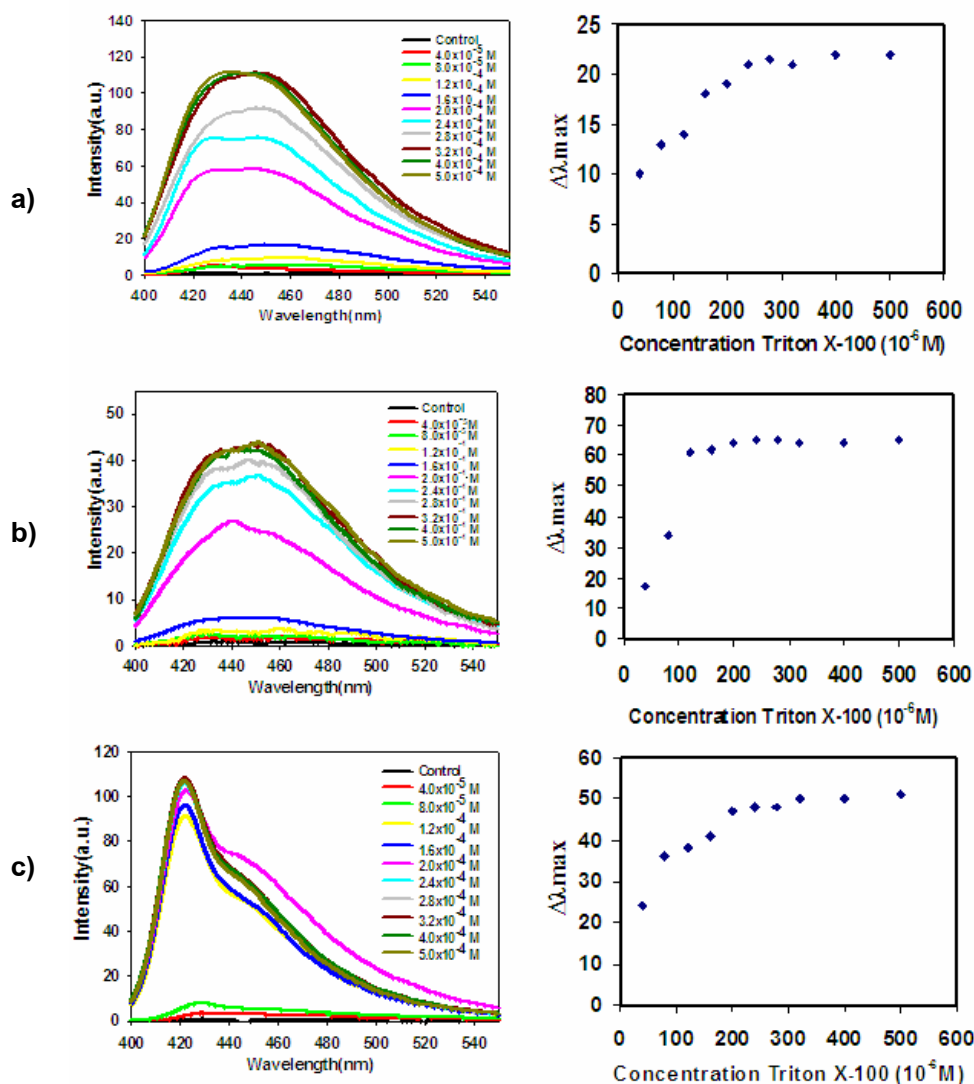
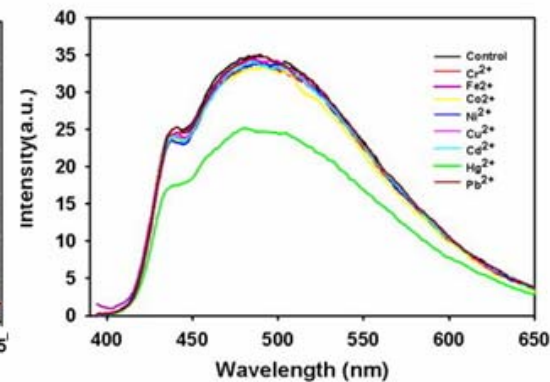
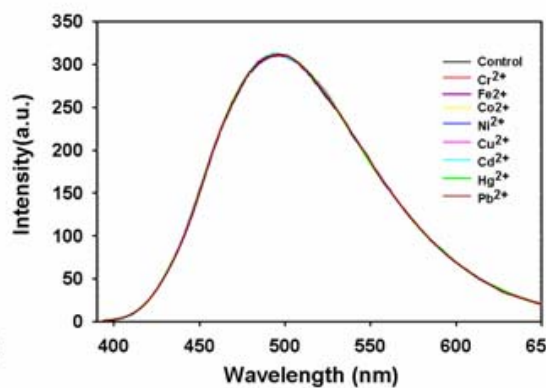
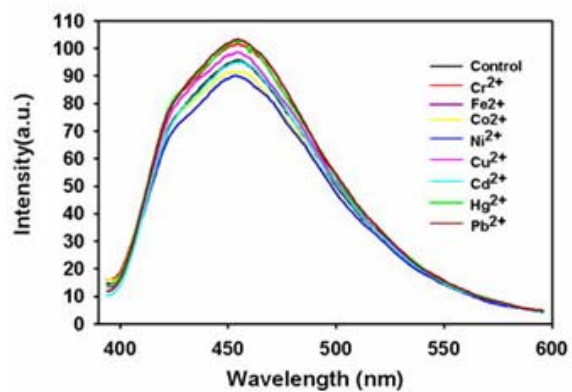


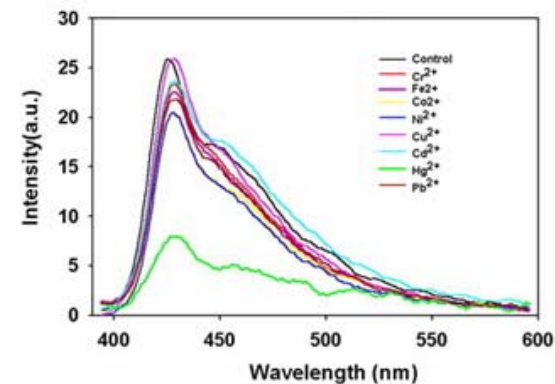
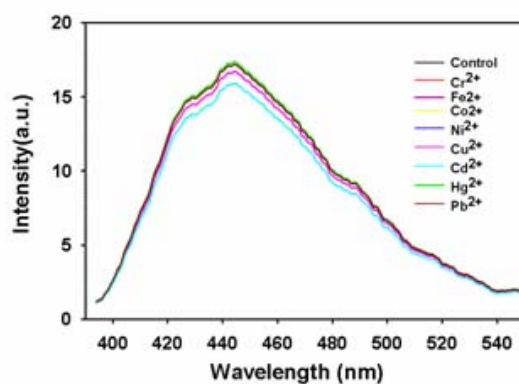
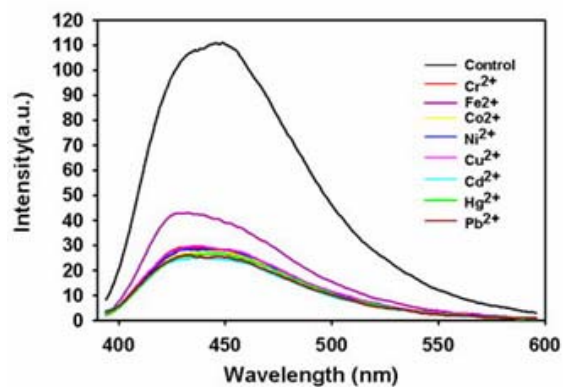
Figure 1 Emission spectra of solutions of a) **1** (1×10^{-6} M) b) **2** (0.1×10^{-6} M) c) **3** (0.1×10^{-6} M) with by addition of increasing concentration of triton X-100. $\Delta\lambda_{max}$ plot with concentration of triton X-100

เมื่อนำสารทั้งสามไปตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ภายใต้ภาวะที่มีไอออนของโลหะ $2+$ พบว่าไอออนทุกชนิดไม่สามารถเปลี่ยนแปลงสัญญาณของสาร **1** ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเติม Triton X-100 แล้วพบว่าไอออนทุกชนิดที่นำมาศึกษาสามารถลดสัญญาณของสาร **1** ได้ สำหรับสาร **2** ซึ่งมีหมู่ปลายเป็น $-NMe_3^+$ พบว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมไอออนของโลหะแม้ว่าจะใช้ surfactant แล้วก็ตาม สำหรับสาร **3** ซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีหมู่ปลายเป็น $-COO^-$ นั้นสามารถแสดงสัญญาณที่ลดลงได้เฉพาะเมื่อมีไอออน Hg^{2+} โดยการลดลงของสัญญาณจะชัดเจนขึ้นเมื่อมี Triton X-100 ในระบบ (Figure 2)

without
Triton X-100



with
Triton X-100



a)

b)

c)

Figure 2. Emission spectra of a) **1** b) **2** c) **3** (10×10^{-6} M) without and with triton X-100 (0.1 mM) by addition of 40×10^{-6} M solution of metal ions.

การใช้ปริมาณของ Triton X-100 surfactant ที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการขยายสัญญาณมากที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นภาวะที่ให้ sensitivity สูงที่สุดในการตรวจวัด Hg^{2+} ค่าความเข้มข้นของ surfactant ถูกกำหนดโดยการทดลองวัดค่า I_0/I ที่ความเข้มข้นของ surfactant ต่างๆกัน ซึ่งพบว่าจะได้การขยายสัญญาณของสาร **3** มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของ Triton X-100 เท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ (0.1 มิลลิโมลาร์)

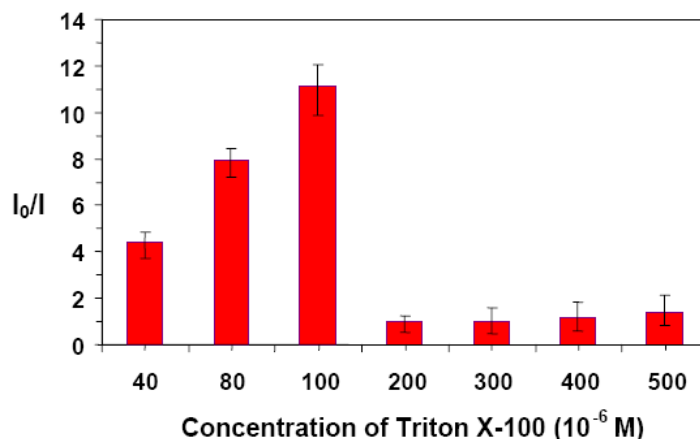


Figure 3. I_0/I plots for the **3** (0.1 μM) – Triton X-100 complex with Hg^{2+} (40 μM).

ประสิทธิภาพในการจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสาร **3** ด้วย Hg^{2+} สามารถหาได้โดยใช้ Stern-Volmer plot ซึ่งพบว่าค่า Stern-Volmer constant (K_{SV}) ในระบบที่มี Triton X-100 มีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับระบบที่ไม่มี Triton X-100 (33,700 M^{-1} เทียบกับ 5,800 M^{-1}) (Figure 4)

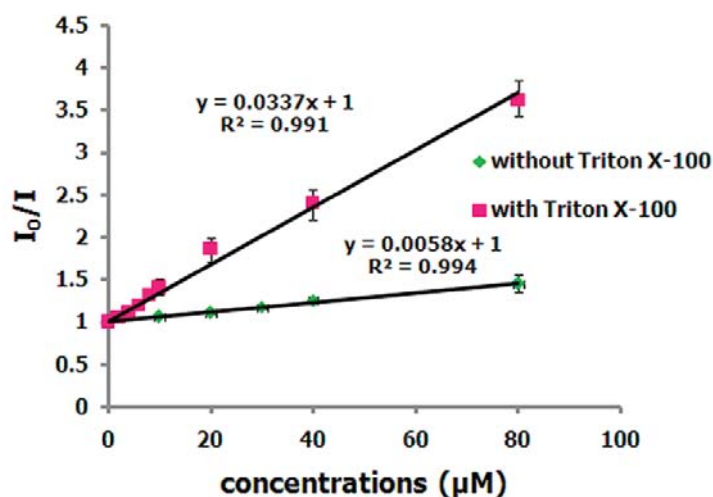


Figure 4. Stern-Volmer plots for fluorescence quenching of **3** (0.1 μM) with and without Triton X-100 (0.1 mM)

ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ใช้สาร **3** ซึ่งมีความจำเพาะต่อ Hg^{2+} ในการตรวจหาปริมาณของไอออนดังกล่าวในตัวอย่างที่เป็นน้ำ และเมื่อใช้ร่วมกับ surfactant จะทำให้ได้ระบบที่มี sensitivity มากขึ้น นอกจากนี้ ยังสามารถทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่หายไปเมื่อมี Hg^{2+} กลับคืนมาได้โดยใช้ EDTA ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการจับกับไอออนนี้ได้ดีกว่าสาร **3** (Figure 5)

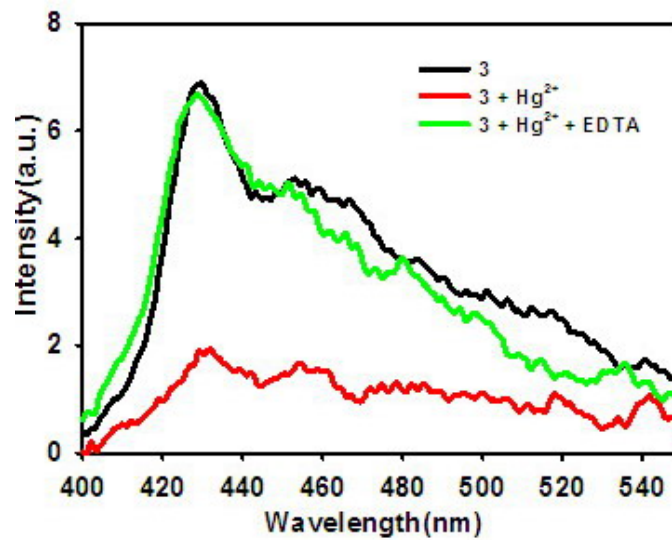
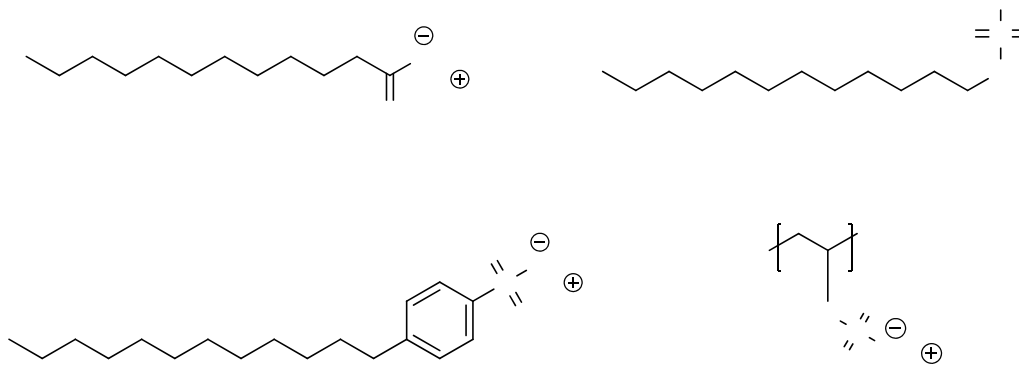


Figure 5 Change in emission spectra of 3 + Triton X-100 (0.1 mM) + Hg^{2+} (40 μM) with the addition of 100 μM EDTA.

ในการศึกษาฟลูออโรฟอร์ 2 ที่มีหมู่ peripheral แบบประจุบวกพบว่าการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ในระบบที่มี surfactant ชนิดต่างๆ เช่น SD, SDS, และ SDBS แอนไอออนิกโพลีเมอร์เช่น PVSK ดีเอ็นเอ ทั้งแบบสายเดี่ยวและสายคู่ รวมทั้งโปรตีนที่มีส่วนที่เป็นแอนไอออนิกเช่น bovine serum albumin (BSA) โดยมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงดังแสดงใน Figure 6-11



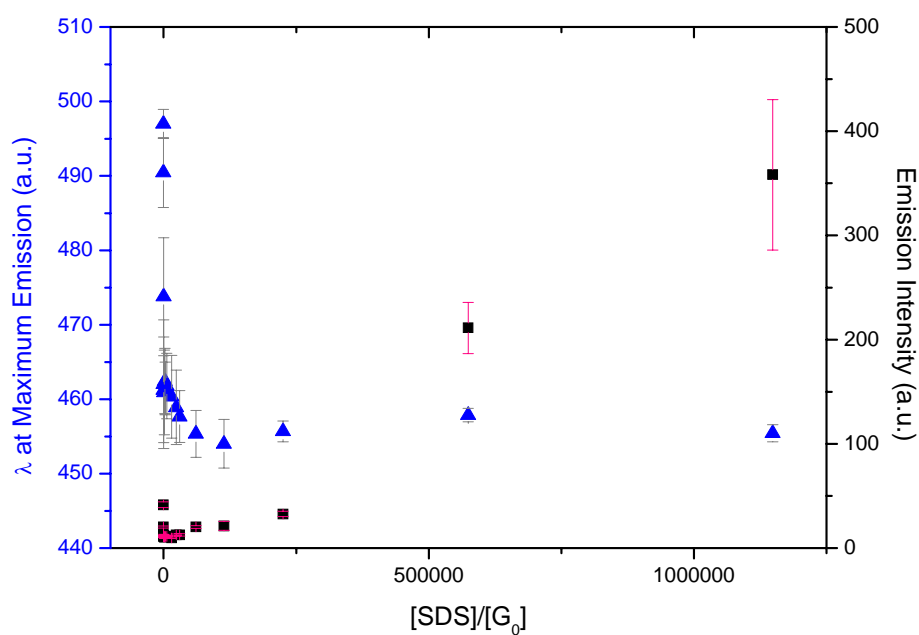
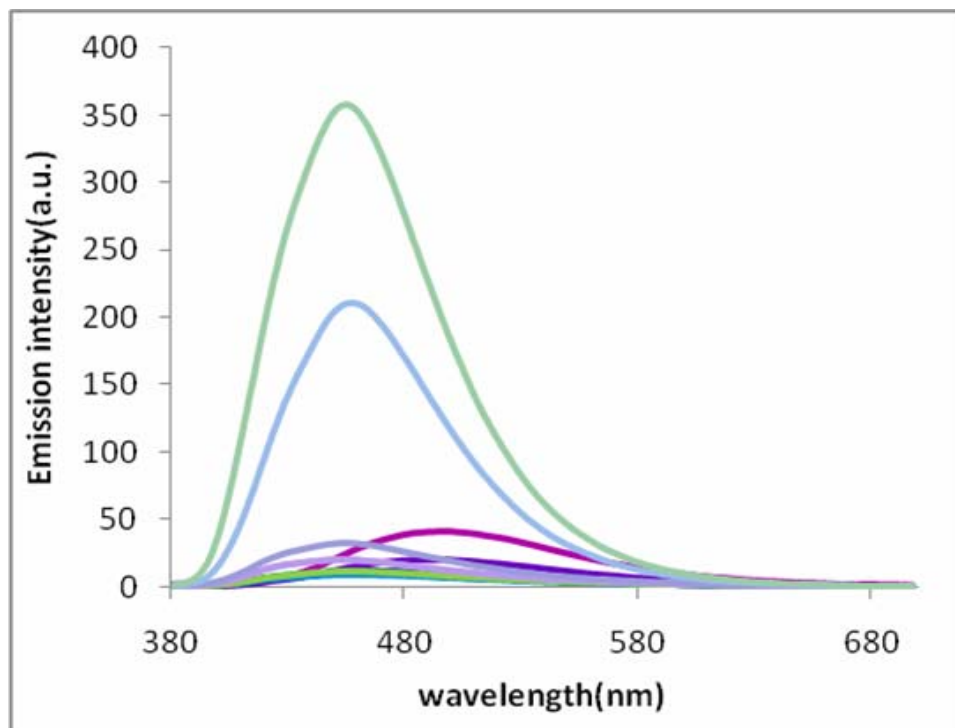


Figure 6 Top) Fluorescence spectra, and Bottom) Wavelength shifting at maximum emission (blue) and emission intensity (black) of **2** (0.86 μM) at various concentration of sodium dodecyl sulfate (SDS) in MilliQ water. Data are shown as the mean \pm 1SD and are derived from three repeat analyses per sample and three independent samples. Excitation wavelength = 370nm, PMT= 600.

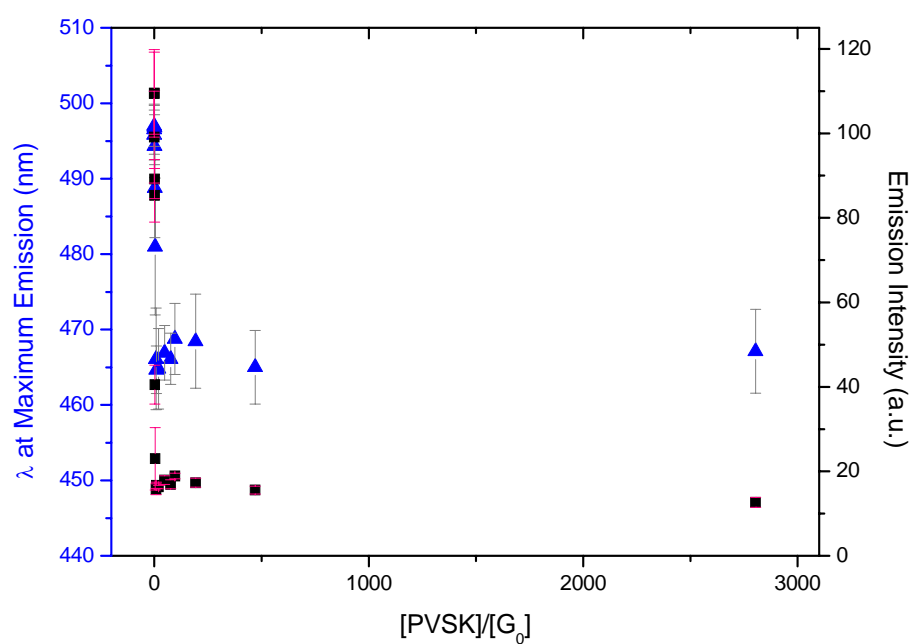
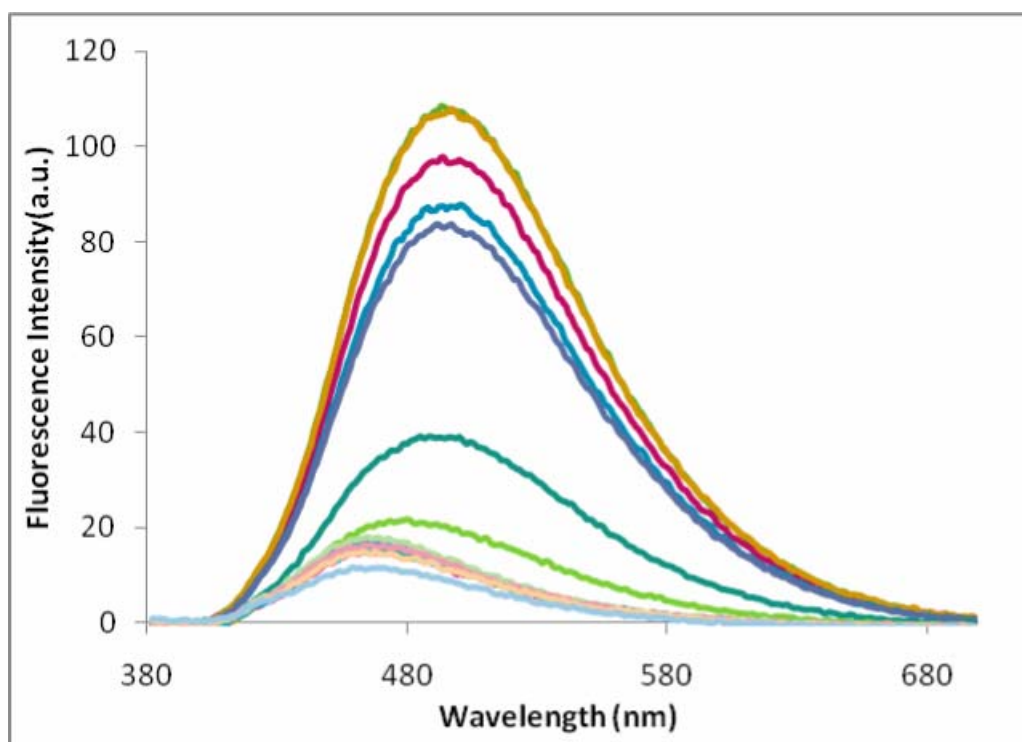


Figure 7 Top) Fluorescence spectra, and Bottom) Wavelength shifting at maximum emission (blue) and emission intensity (black) of **2** ($0.91 \mu\text{M}$) at various concentration of PVSK in MilliQ water. Data are shown as the mean \pm 1SD and are derived from three repeat analyses per sample and three independent samples. Excitation wavelength = 370nm, PMT= 600.

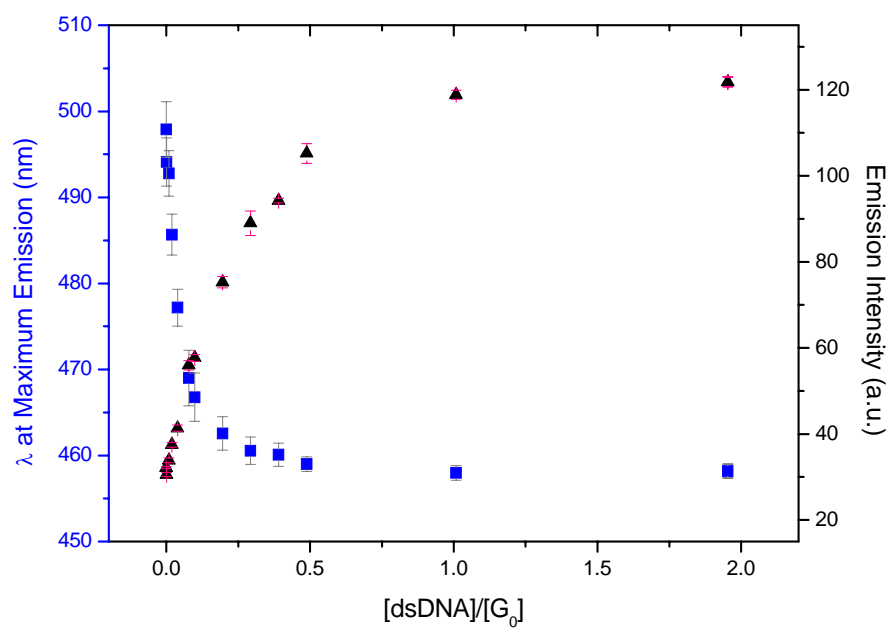
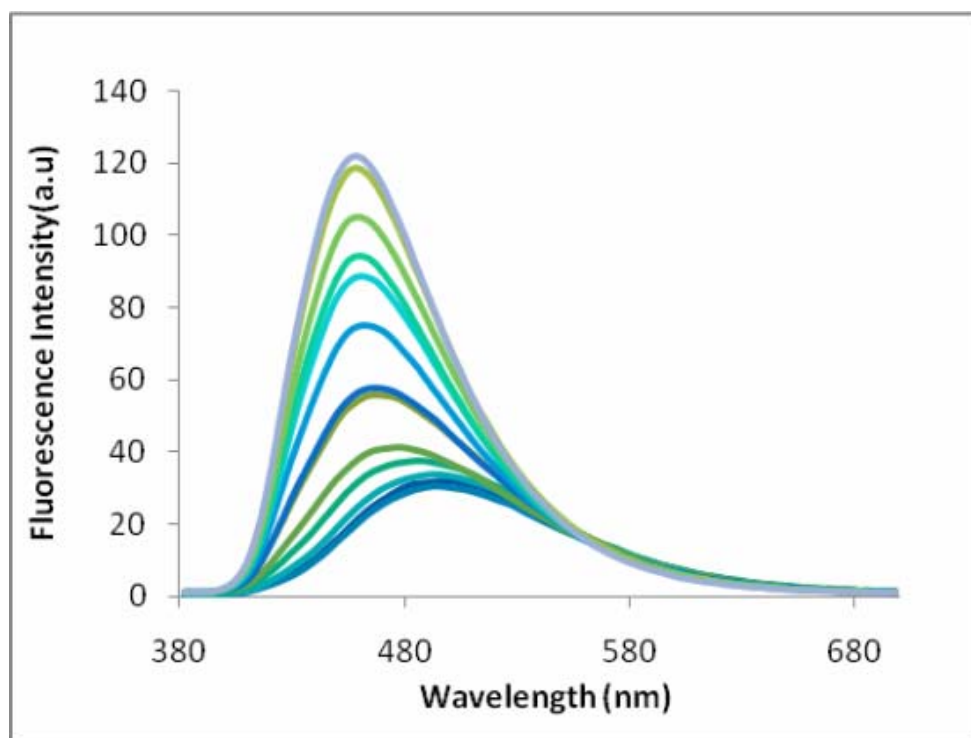


Figure 8 Top) Fluorescence spectra, and Bottom) Wavelength shifting at maximum emission (blue) and emission intensity (black) of **2** (1.0 μM) in the presence of various concentrations of dsDNA [P1(=5'GCA TAT GCC TA3')+P1A(=5'TA GGC ATA TGC3')] in 10mM phosphate buffer pH 6.56, and 150 mM NaCl. Data are shown as the mean \pm 1SD and are derived from three repeat analyses per sample and three independent samples. Excitation wavelength = 370nm, PMT= 540.

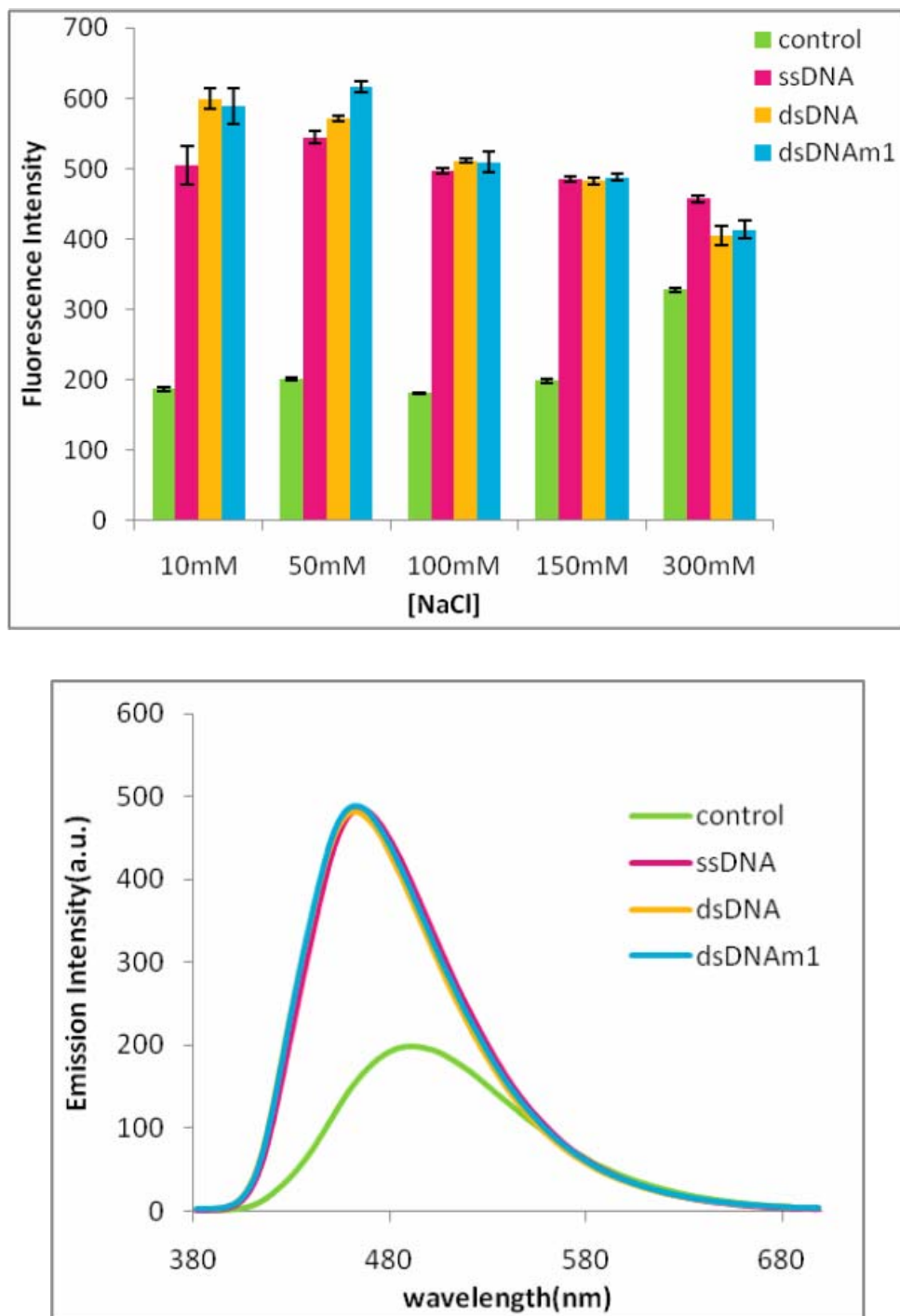


Figure 9 Top) Emission intensity at maximum wavelength at various concentrations of NaCl (10, 50, 100, 150, and 300 mM), and bottom) Fluorescence spectra in NaCl 150 mM of **2** (2.5 μM) in the absent (green) and the present of ssDNA(P1(= 5'GCA TAT GCC TA3')) 0.50 μM (pink), dsDNA(P1+P1A(= 5'TA GGC ATA TGC3')) 0.25 μM (yellow), and dsDNA_{m1}(P1+P2(= 5'GCA TAT GCA TA3')) 0.25 μM (blue) respectively. Condition: 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.56/MilliQ water. Data are shown as the mean \pm 1SD and are derived from 3 repeat analyses per sample and 3 independent samples. Excitation wavelength = 370nm, PMT= 600.

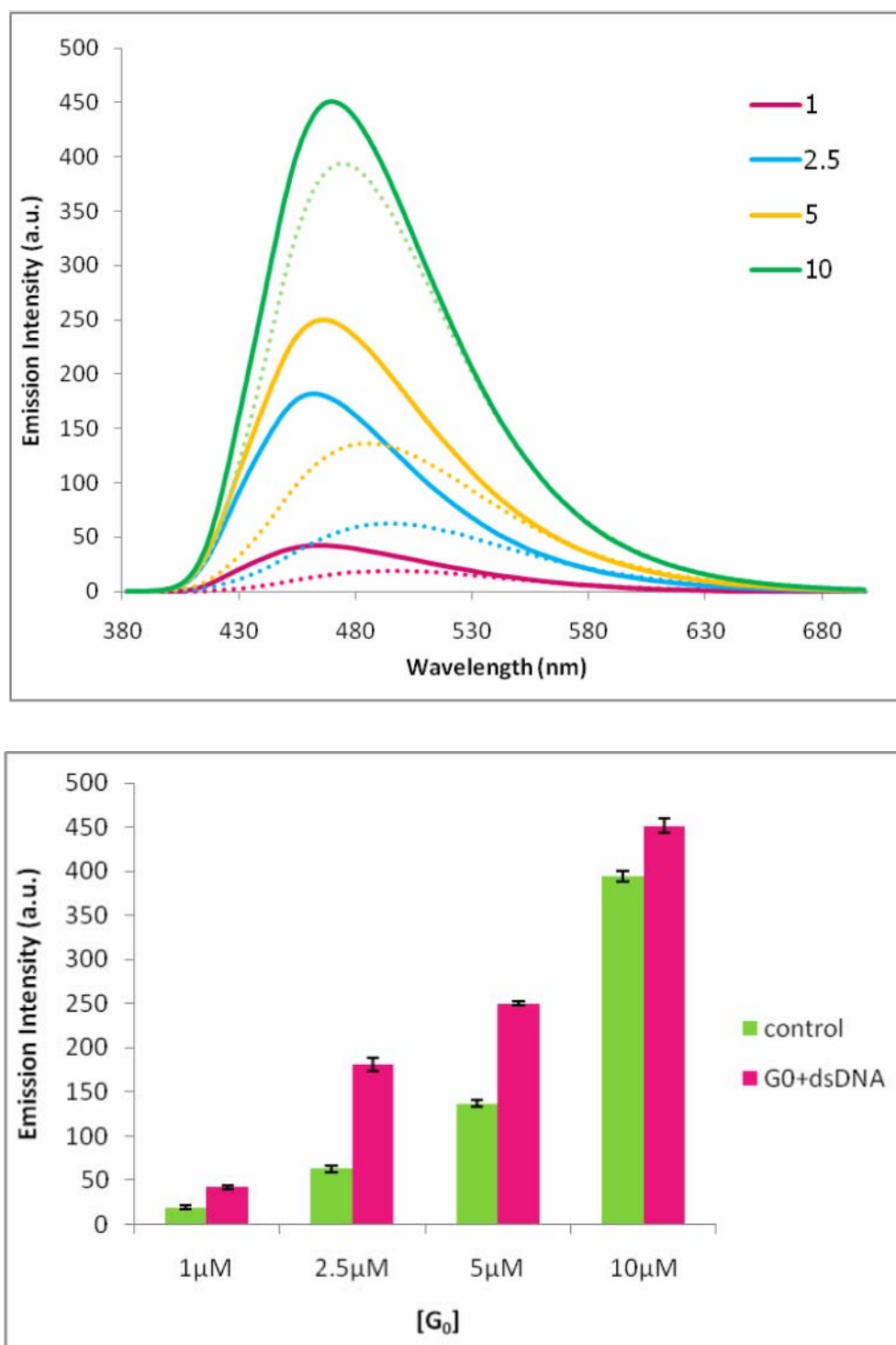


Figure 10 Top) Fluorescence spectra of the different concentration **2** (1.0, 2.5, 5.0, and 10 μM) without (dash line) and with (solid line) dsDNA (P1(=5'GCA TAT GCC TA3')+P1A(=5'TA GGC ATA TGC3')) 0.25 μM , and bottom) Histogram of emission intensity at maximum wavelength of the different concentration of **2** (1.0, 2.5, 5.0, and 10 μM) without (green) and with (pink) dsDNA (P1(=5'GCA TAT GCC TA3')+P1A(=5'TA GGC ATA TGC3')) 0.25 μM in 10mM sodium phosphate buffer pH 6.56 and 150 mM NaCl. Excitation wavelength = 370nm, PMT= 600.

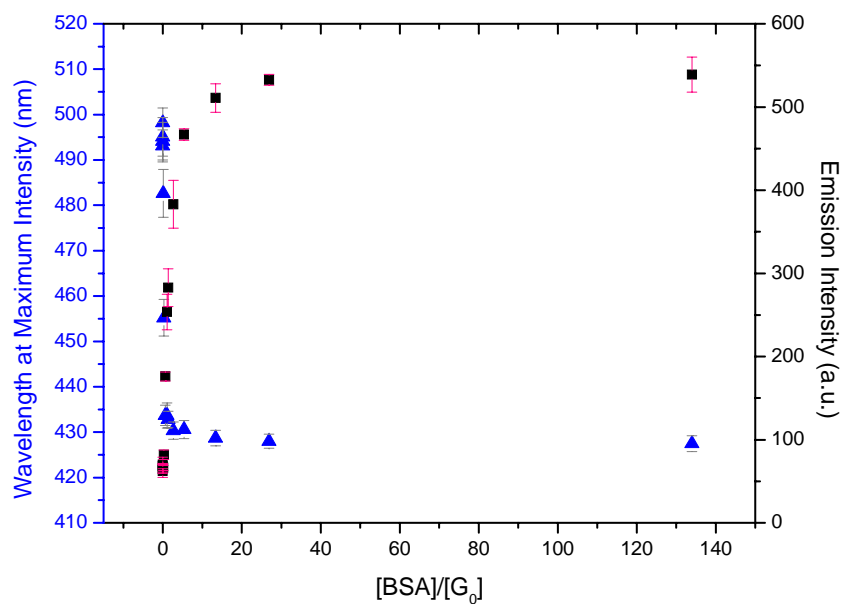
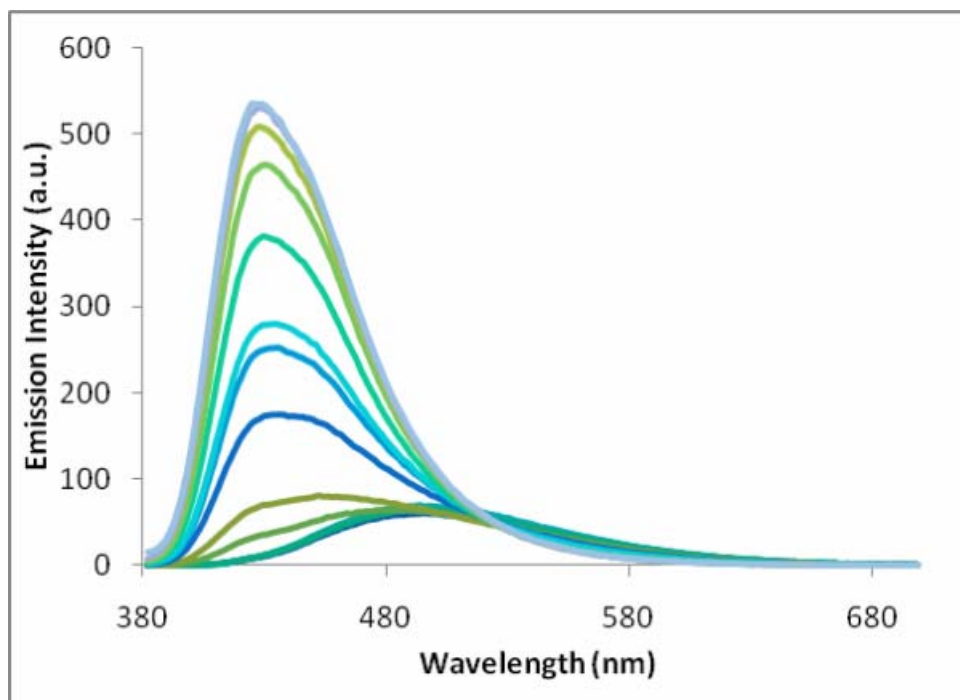


Figure 11 Top) Fluorescence spectra, and bottom) Wavelength shifting at maximum emission (blue) and emission intensity (black) of **2** (0.91 μM) in the present of various concentration of bovine serum albumin (BSA) in 10 mM phosphate buffer pH 6.56. Data are shown as the mean \pm 1SD and are derived from three repeat analyses per sample and three independent samples. Excitation wavelength = 370nm, PMT= 600.

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในโครงการนี้ผู้วิจัยได้สังเคราะห์สารประกอบเรืองแสงแบบเดนดริเมอร์ที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด 3 ตัว และพบว่าสารที่มีหมู่ฟีนิลลีนเอทไธนลีนเก้าหมู่ และมีหมู่ช่วยให้ละลายน้ำเป็นหมู่คาร์บอกซิเลตหกหมู่ สามารถแสดงสมบัติการดับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence quenching) ได้อย่างจำเพาะเจาะจงด้วยไอออน Hg^{2+} โดยจะสมบัติดังกล่าวจะเด่นชัดมากขึ้นเมื่อมีสารปรับพื้นผิว (surfactant) เช่น Triton X-100 ผสมอยู่ด้วย และสามารถหาประสิทธิภาพในการดับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้จาก Stern-Volmer plot โดยพบว่ามีค่า K_{SV} สูงถึง $33,700 \text{ M}^{-1}$

ส่วนสารที่มีหมู่ฟีนิลลีนเอทไธนลีนสามหมู่และมีหมู่ไตรเมทิลแอมโมเนียมสามหมู่สามารถแสดงการเปลี่ยนสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้เมื่อมีสารปรับพื้นผิว โพลีเมอร์ที่มีประจุลบ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ หรือโปรตีนที่มีประจุลบเช่น Bovine serum albumin ได้ โดยลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัญญาณจะขึ้นอยู่กับลักษณะทางโครงสร้างของสาร

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ในงานวิจัยขั้นต่อไปจะมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารสังเคราะห์ โดยจะใช้วิธีเปลี่ยนแกนกลางของสารเพื่อให้ได้โครงสร้างที่มีความอิสระน้อย ซึ่งอาจนำไปสู่สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นน้อยลง หรืออาจเปลี่ยนแกนกลางเป็นพวงอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเพื่อเพิ่มความเสถียร นอกจากนี้ยังสามารถปรับเปลี่ยนชนิดของหมู่ peripheral โดยอาจใช้หมู่แทนที่แบบ non-ionic hydrophilic group เช่นสายโพลีเอทิลีนไกลคอล ซึ่งจะทำให้สารที่ได้สามารถละลายน้ำได้ในช่วงพีเอชที่กว้างขึ้น หรืออาจจะใส่หมู่แทนที่มากกว่า 1 ชนิดในโมเลกุล ซึ่งจะทำให้ได้สารประกอบที่มีสมบัติ amphoteric ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการตรวจจับสารชีวภาพจำพวกโปรตีน เป็นต้น

ภาคผนวก

สำเนาผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติที่ตีพิมพ์แล้ว

Nakorn Niamnont, Warathip Siripornnoppakhun, Paitoon Rashatasakhon and Mongkol Sukwattanasinitt "A Polyanionic Dendritic Fluorophore for Selective Detection of Hg^{2+} in Triton X-100 Aqueous Media" *Organic Letters*, **2009**, 11 (13), 2768-2771

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติที่ตีพิมพ์แล้ว

Nakorn Niamnont, Warathip Siripornnoppakhun, Paitoon Rashatasakhon and Mongkol Sukwattanasinitt "A Polyanionic Dendritic Fluorophore for Selective Detection of Hg^{2+} in Triton X-100 Aqueous Media" *Organic Letters*, **2009**, 11 (13), 2768-2771

ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติที่กำลังจัดทำ manuscript

ชื่อเรื่อง Fluorogenic Responses of Cationic Fluorophore Containing Triple Branched Phenyleneethynylene upon Supramolecular Interaction เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร ACS Applied Materials & Interfaces