

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 化學科

第三名

050210

設計與合成活性螢光探針應用於硫化氫之偵測

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 李欣恬 高二 雷芃嫻	指導老師： 陳祖望
---------------------------------	------------------

關鍵詞：螢光探針、硫化氫、有機合成

摘要

本研究設計出一款新型偵測硫化氫之螢光探針，螢光主結構選用 BTIC，以疊氮基偵測硫化氫，利用側鏈將探針帶入粒線體。本實驗已合成出 BTIC-N₃ 和 BTIC-N₃-2，並透過 NMR 氫譜確認獲得目標產物。利用 UV 燈及螢光光譜儀證實兩款探針對於硫化氫的偵測能力並且兩款探針在 10 分鐘內皆可顯現出最高螢光強度，且 BTIC-N₃-2 具較佳的螢光效果。此外，在選擇性測試中，加入硫化氫的探針產生之最高螢光強度約為其他試劑的 9 倍，確認了探針對硫化氫的高度選擇性。最後，我們預計將探針實際進行生物顯影，做多個結構顯影的比對。希望此款螢光探針除硫化氫偵測外，還能夠進行生物機制探討或疾病細胞篩選的應用。

壹、前言

一、研究動機

醫學研究已知硫化氫參與多種生理作用，作用位置包含心血管、循環、呼吸、泌尿和神經系統等，在生物體內扮演重要角色。生物體內硫化氫濃度的異常可能與高血壓、糖尿病和阿茲海默症等多種生心理疾病的發生有關。因此，硫化氫的偵測至關重要。

目前在硫化氫的偵測尚有許多限制，例如：探針偵測時間短，多數傳統方法(比色法、電化學測定法等)會破壞細胞組織、需要繁瑣的準備過程…等。因此，我們想要設計一款螢光探針在不破壞細胞組織的前提下，藉由探針與硫化氫的反應，達到偵測硫化氫的效果。另外，也希望此螢光探針可以具備高靈敏性以及高選擇性等優勢，並且在細胞中偵測硫化氫時可以有良好的顯影效果。

我們計畫選用硫化氫濃度較高的粒線體內作為探針的偵測反應環境，因此我們設計了側鏈結構，預期可將螢光探針帶入至粒線體中並進行顯影。我們期許此研究設計之螢光探針能在粒線體中達到硫化氫顯影效果，成為一款有效的粒線體硫化氫活性螢光探針，提供未來做生物機制探討或疾病細胞篩選的應用。

二、研究目標

- (一) 設計螢光探針結構
- (二) 合成基本探針結構
- (三) 利用各項螢光測試，確認探針偵測硫化氫之效果
- (四) 合成並接上側鏈

三、文獻回顧

(一) 硫化氫與疾病

硫化氫為一種刺激性氣體，是繼 NO 和 CO 後第三種被發現的生理氣態信號分子，主要由胱硫醚合成酶 (CBS)、胱硫醚 γ 裂解酶 (CSE)、和 3-巰基丙酮酸硫轉移酶 (3-MST) 生成並參與多種生理和病理機制，包括血壓調節、發炎反應、神經退化疾病等。硫化氫具抗氧化、緩阻細胞凋亡的功能，因此常在神經退化疾病患者體內出現異常生成和代謝的狀況，如阿茲海默症和帕金森氏症。而其對多器官的保護作用，可能使其成為獨立治療心血管和腎臟疾病的理想工具。基於硫化氫在病理上的重要性，許多研究正致力於開發其相關藥物及療法。然而，體內硫化氫由於複雜的化學性質，如揮發性和反應活性高、分解代謝快等，使其檢測仍面臨許多挑戰。(Ibrahim, H., Serag, A., & Farag, M. A, 2021)

(二) 硫化氫偵測方法

1. 硫化氫偵測方法探討

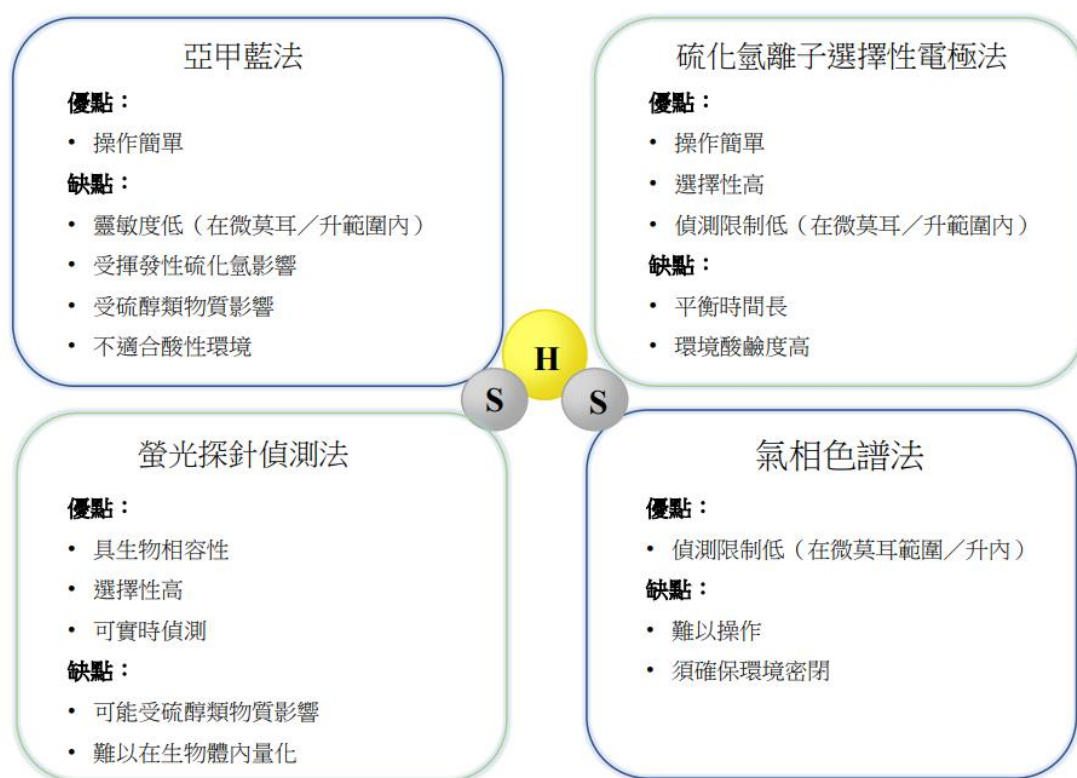


圖 1：硫化氫偵測方法優缺點比對圖

目前已有多種方法被開發用於檢測硫化氫，例如：亞甲藍法、硫化氫離子選擇性電極法和氣相色譜法等。然而，以上方法根據文獻分析都具有一些缺點。亞甲藍法檢測靈敏度較低（在微莫耳每升範圍），且容易在測量過程中造成測定物逸散而產生測量誤差，此方法也不適用於酸性條件。而硫化氫離子選擇性電極法的主要缺點是需要較長的反應時間，而氣相色譜法的則為需要保持測定氣體的密封性。而螢光探針偵測法在現今普遍被認為是最有效的方法，因為其具有低成本、高生物相容性、實時偵測和高選擇性等優點，並使其成為了硫化氫生物學研究的重點。(上述各硫化氫偵測方法分析參考 Haonan Li et al., 2003)

2. 理想螢光探針條件

根據 Hany Ibrahim, Ahmed Serag, Mohamed A. Farag, 2020 的論文，理想的螢光探針設計應滿足下列條件：

- (1) 對硫化氫檢測靈敏度高。
- (2) 具有實時監測硫化氫的效果。

- (3)能在生理條件下（即水溶液、血液、血漿）自發地反應而無需外加有機溶劑或界面活性劑。
- (4)對硫化氫表現出高選擇性，不受到細胞中其他硫醇類、金屬離子、常見還原劑或氧化劑干擾。
- (5)細胞毒性低且生物相容性高
- (6)具有針對特定目標進行偵測的功能，例如：胞器（粒線體、溶酶體、細胞核等）、某些細胞（肝細胞等）、組織或器官。

貳、研究設備及器材

一、設備與器材

(一) 設備

- 1. 超音波清洗機
- 2. 核磁共振光譜儀
- 3. 螢光光譜儀
- 4. 旋轉濃縮儀
- 5. 電磁攪拌器
- 6. 抽氣裝置
- 7. 加熱板

(二) 器材

- 1. 萃取瓶
- 2. 玻璃管柱
- 3. TLC 層析片
- 4. 圓底瓶
- 5. 滴管
- 6. 緩衝瓶
- 7. 樣本瓶
- 8. 燒杯

二、藥品

- (一) 2-羥基-5-硝基苯甲醛 (2-Hydroxy-5-nitrobenzaldehyde)
- (二) 二甲硫基甲烷 ($C_3H_8S_2$)
- (三) 三氟化硼乙醚 ($(C_2H_5)_2O \cdot BF_3$)
- (四) 鋅 (Zn)
- (五) 亞硝酸鈉 ($NaNO_2$)
- (六) 疊氮化鈉 (NaN_3)
- (七) 樟腦磺酸 (Camphorsulfonic acid)
- (八) 2-氨基苯硫酚 (2-aminothiophenol)
- (九) 丙二腈 (malononitrile)
- (十) 4-二乙氨基-2-羥基苯甲醛 (4-Diethylamino-2-hydroxybenzaldehyde)
- (十一) 碳酸鈉 (Na_2CO_3)
- (十二) 三甘醇單甲醚 (Triethylene glycol monomethyl ether)
- (十三) 甲苯磺酰氯 (Tosyl chloride)
- (十四) 二甲基甲醯胺 (DMF)
- (十五) 硫酸鈉 (Na_2SO_4)
- (十六) 哌啶 (piperidine)
- (十七) 硫氫化鈉 (NaSH)

參、研究過程或方法

一、研究流程

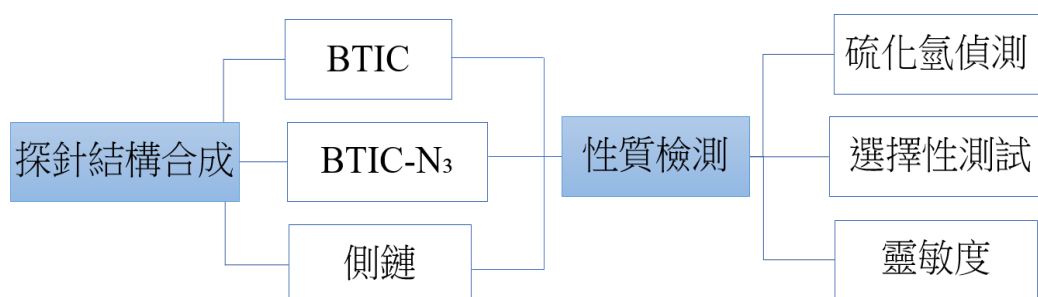


圖 2：研究流程

二、探針設計

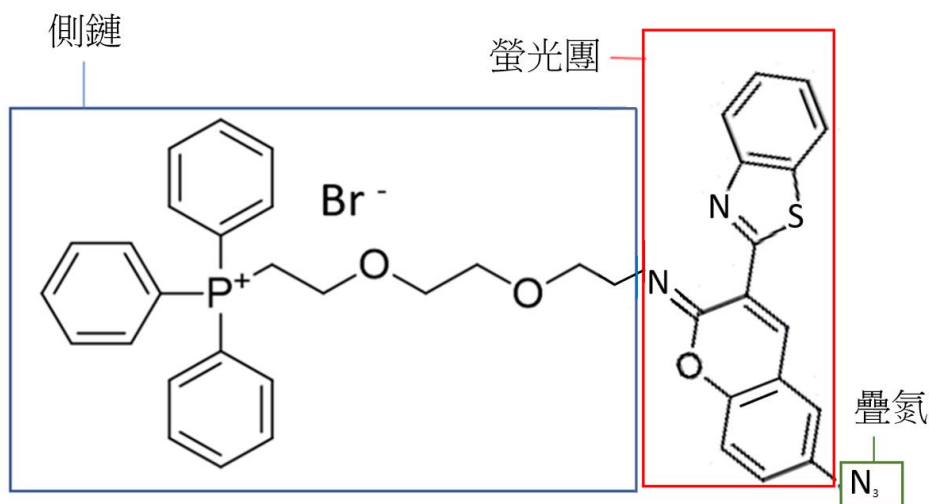


圖 3：探針設計

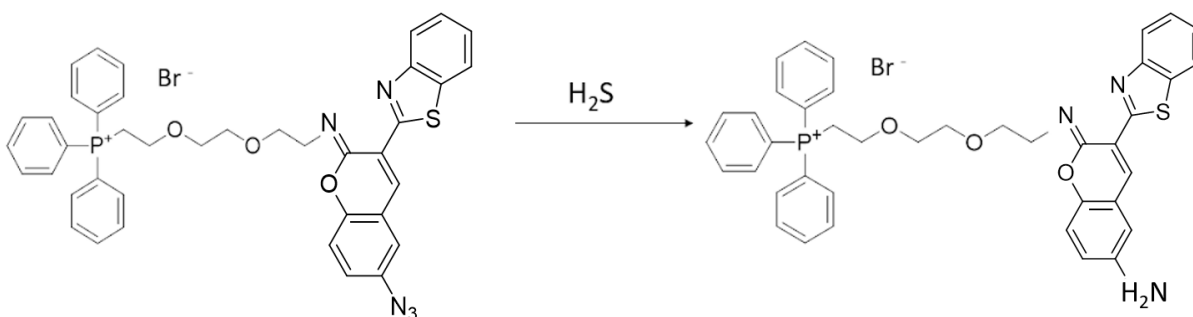


圖 4：探針偵測 H₂S 示意圖

(1) 螢光團選擇

經由閱讀相關文獻後，決定選用 BTIC 作為探針的螢光基團。

選用 BTIC 的原因有下列兩點：

第一，因為 BTIC 具有四個苯環結構，共軛體系較大，共軛的 π 電子較容易受到低能量光子的影響。若光子的能量較小，則其波長相對較大，發出的螢光會出現在長波長範圍。因此我們的設計，藉由選用 BTIC 螢光基團使探針所發出的螢光波長較長，參考過去對 BTIC 螢光基團進行的研究，可預測我們的探針所發出螢光大約會落在 495 至 570 奈米之間，也就是呈現綠色的螢光，讓肉眼可以更容易觀察到螢光強度的變化，藉此增加探針未來進行生物硫化氫偵測的應用性。

第二，因為 BTIC 的結構相對較小。我們經過文獻探討，發現已有其他結構較大之探針能成功進入細胞進行顯影，因此我們推測，BTIC 結構大小不會阻礙探針進入細胞，並且因為其結構較小，應該有助於提升探針帶入至細胞或粒線體內的成功率，利於未來醫學檢驗相關的應用。

(二) 偵測硫化氫結構設計

經由文獻探討後，我們選用疊氮作為偵測硫化氫的結構，並修飾在 BTIC 螢光團上。我們選用疊氮出於以下兩點原因。

第一，此設計在與硫化氫反應前後亮度推測具有明顯差異，BTIC 在修飾上疊氮結構後螢光強度弱，在與硫化氫反應過後之結構（如圖 4）則推測具有明顯螢光，因此產生顯著差異，有利我們觀測其前後變化，達到偵測的效果。

第二，我們推測此設計的靈敏度強。因為苯環為拉電子基，會造成疊氮結構中與苯環連接的氮原子鍵能較低，進而較容易發生反應，因此推論它的靈敏度強。

(三) 疊氮位置

由於探針的修飾結構在不同位置上會造成探針不同的螢光性質，本研究設計了另一個探針結構，（如圖 6），稱之為 BTIC-N₃-2。BTIC-N₃ 結構上，疊氮的最低未占分子軌道具較低的波函數密度，會減少硫化物對疊氮的還原，因此推測 BTIC-N₃-2 的螢光反應會較 BTIC-N₃ 佳，後續也會進行相關的螢光測試及比較。

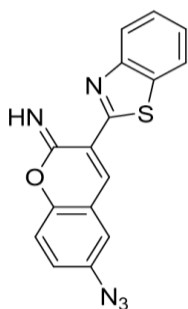


圖 5：BTIC-N₃

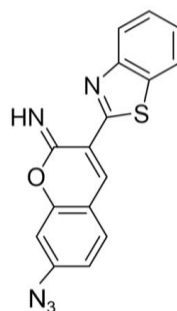


圖 6：BTIC-N₃-2

(四) 側鏈設計

側鏈設計的目的為增加探針的水溶性，並連接 PPH3 結構。因為側鏈為醚組成，所以較長的側鏈可以增加水溶性，而小的側鏈方便製備，因此我們折衷設計三個 C₂H₄O 單體作為我們的側鏈結構，來進行粒線體硫化氫偵測的帶入及應用。

我們進一步將側鏈設計上 PPH3，因為粒線體中的氫離子濃度梯度差和含有許多硫醇類物質使其環境偏負電，而 PPH3 結構帶正電，探針因此藉由此結構與粒線體之間的電位差達到將探針帶入粒線體中的效果。另外，在過去文獻中，有其他接近我們探針結構的尺寸成功將他們的探針帶入至粒線體中，因此我們推測我們的探針設計可以利用 PPH3 帶入粒線體。除此之外，此設計之側鏈的立體結構也推測能在帶入及偵測的過程中保護探針連接側鏈的 CN 雙鍵不容易水解，使探針結構更穩定存在。

三、研究步驟

(一) 探針結構合成

1. 合成 BTIC 和 BTIC-N₃

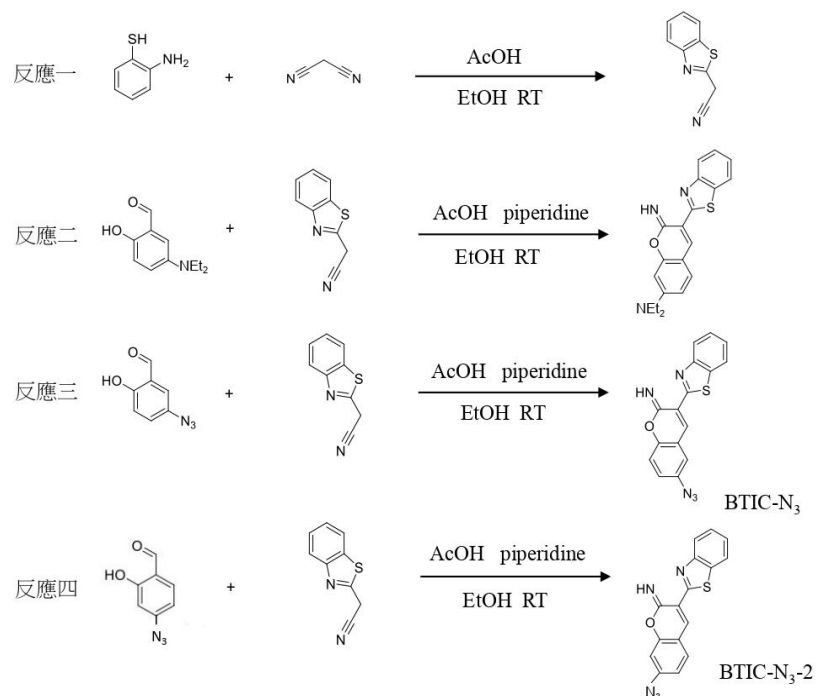


圖 7：探針結構合成步驟

反應一：

	分子量	當量	型態
2-aminothiophenol	125.19	1	液體
malononitrile	66.26	2	固體
AcOH	60.05	140	液體

- (1) 將 malononitrile 加入乙酸中，2-aminothiophenol 加入乙醇中，並將兩個溶液混合，於室溫下攪拌 12 小時
- (2) 點 TLC 片確認反應完成後，將溶液過濾。再用 300 毫升蒸餾水沖洗殘留物，即為部分產物
- (3) 濾液用 EtOAc 萃取三次，再用飽和食鹽水萃取一次，將有機層用 Na₂SO₄ 除水，並用旋轉濃縮儀進行濃縮。最後兩部分產物混合得全部產物

反應二：

	分子量	當量	型態
4-Diethylamino-2-hydroxybenzaldehyde	193.25	1	固體
反應一產物	174.3	2	固體
AcOH	60.05	5.3	液體
piperidine	85.15	3.25	液體

- (1) 將反應物溶於 EtOH 中，加入 piperidine 攪拌 1 小時，再將 AcOH 滴入並反應一小時
- (2) 將溶液過濾，用 EtOH 沖洗固體，固體即為產物

反應三：

	分子量	當量	型態
反應物	163.25	1	固體
反應一產物	174.3	2	固體
AcOH	60.05	5.3	液體
piperidine	85.15	3.25	液體

- (1) 將反應物溶於 EtOH 中，加入 piperidine 攪拌 1 小時，再將 AcOH 滴入並反應一小時
- (2) 將溶液過濾，用 EtOH 沖洗固體，固體即為產物

反應四：

	分子量	當量	型態
反應物	163.25	1	固體
反應一產物	174.3	2	固體
AcOH	60.05	5.3	液體
piperidine	85.15	3.25	液體

- (1) 將反應物溶於 EtOH 中，加入 piperidine 攪拌 1 小時，再將 AcOH 滴入並反應一小時
- (2) 將溶液過濾，用 EtOH 沖洗固體，固體即為產物

2. 合成側鏈

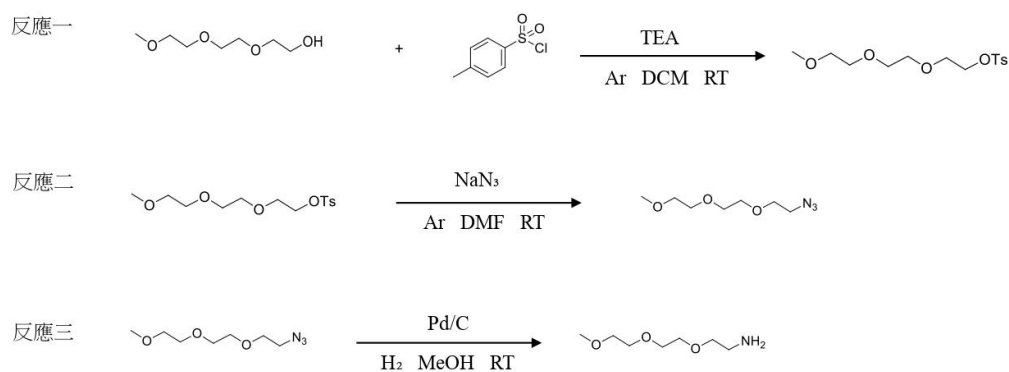


圖 8：側鏈合成步驟

反應一:

	分子量	當量	型態
Triethylene glycol monomethyl ether	164.202	1	液體
Tosyl chloride	190.65	1	固體
三乙胺	101.19	1.2	液體

- (1) 將 Tosyl chloride 放入圓底瓶中，將空氣置換成氬氣後，溶於 DCM
- (2) 加入 Triethylene glycol monomethyl ether，在冰浴下緩緩加入三乙胺後移除冰浴，於室溫下攪拌 12 小時
- (3) 點 TLC 片確認反應完成，接著用 DCM 萃取三次，再用飽和食鹽水萃取一次，蒸餾水萃取一次，將有機層用 Na₂SO₄ 除水，並用旋轉濃縮儀進行濃縮，即得產物

反應二:

	分子量	當量	型態
反應一產物	353.852	1	液體
NaN ₃	65.01	1.5	固體

- (1) 將 BTIC-N₃ 加入圓底瓶，溶於甲苯中
- (2) 冰浴下將甲基碘緩緩滴入反應，加入 TEA，攪拌 30 分鐘後移除冰浴再攪拌一小時
- (3) 點 TLC 片確認反應完成，以 EA 稀釋，接著用蒸餾水萃取三次，飽和食鹽水萃取一次，並用旋轉濃縮儀進行濃縮
- (4) 用 Hexane 將產物再結晶兩次，將上層濾液移除，沉澱固體即為目標產物

反應二：

	分子量	當量	型態
BTIC	351.38	1	固體
側鏈	163.217	2.2	液體
Camphorsulfonic acid	232.2	3	固體

- (1) 將 BTIC 和 Camphorsulfonic acid 加入圓底瓶，溶於 dry MeCN 中
- (2) 加入側鏈，於 80°C 下反應 12 小時
- (3) 點 TLC 片確認反應完成，接著用 Na₂CO_{3(aq)} 萃取三次，再用飽和食鹽水萃取一次，蒸餾水萃取一次，將有機層用 Na₂SO₄ 除水，並用旋轉濃縮儀進行濃縮
- (4) 用 EA:Hexane=1:5 進行管柱層析

反應三：

	分子量	當量	型態
BTIC-N ₃ -2	319.34	1	固體
側鏈	163.217	2.2	液體
Camphorsulfonic acid	232.2	3	固體

- (1) 將 BTIC-N₃-2 和 Camphorsulfonic acid 加入圓底瓶，溶於 dry MeCN 中
- (2) 加入側鏈，於 80°C 下反應 12 小時

(3) 點 TLC 片確認反應完成，接著用 $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ 萃取三次，再用飽和食鹽水萃取一次，蒸餾水萃取一次，將有機層用 Na_2SO_4 除水，並用旋轉濃縮儀進行濃縮

(4) 用乙醇進行三次再結晶

(二) 性質檢測

1. 初步檢測硫化氫偵測效果

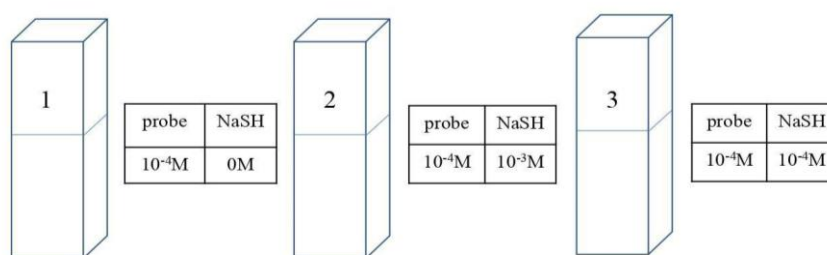


圖 10：硫化氫偵測裝置圖

在三個比色管中分別加入 BTIC- N_3 及 NaSH，三個比色管探針濃度皆為 10^{-4}M ，濃度從左至右分別為 0M、 10^{-3}M 、 10^{-4}M ，探針和 NaSH 的濃度差從左至右分別為 0 倍、10 倍、1 倍。（NaSH 可代替 H_2S 進行檢測，因為兩物質在水中溶解後是一樣的，我們也參考過去文獻因此選定此物質）

加入硫化氫至探針溶液中，在經過 1、2、4 小時時，將混合溶液用 UV 光照射，利用肉眼觀察混和溶液的螢光光強度變化，初步檢測探針對硫化氫的檢測效果。

2. 螢光光譜儀檢測硫化氫偵測效果

將待觀測之探針（BTIC- N_3 或 BTIC- N_3 -2）置入樣品盤，加入 NaSH 進行反應，並利用螢光光譜儀在固定時間觀測，由螢光光譜儀測定之光強度變化分析探針對於硫化氫偵測之效果。

觀測時間：10 分鐘、20 分鐘、30 分鐘、40 分鐘、50 分鐘、60 分鐘

探針濃度： 10^{-4}M 、 10^{-5}M

試劑濃度： 10^{-3}M

3. 選擇性測試

將待觀測之探針置入樣品盤，分別與 NaSH 及細胞內常見氧化劑、還原劑或金屬離子進行反應，並利用螢光光譜儀在固定時間觀測，由螢光光譜儀測定之光強度變化推測探

針是否有跟所加入試劑進行反應，從而分析探針對於硫化氫偵測的選擇專一性。

觀測時間：0 分鐘、10 分鐘、20 分鐘、30 分鐘、40 分鐘、50 分鐘、60 分鐘

探針濃度： 10^{-5}M

試劑濃度： 10^{-3}M

試劑種類：NaSH、NAc-Cys、GHS、Cys、NaOCl、 H_2O_2 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

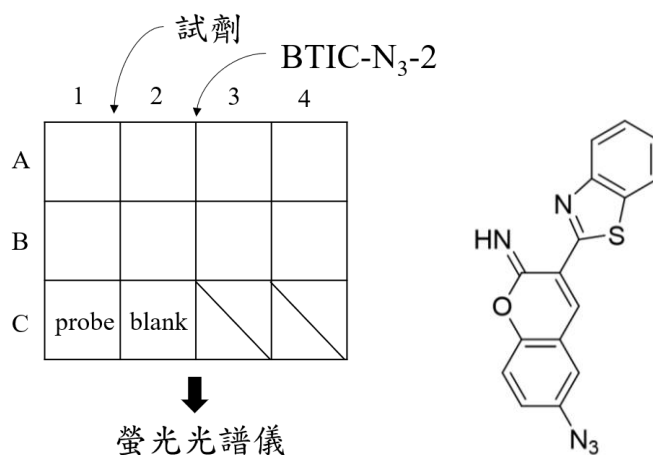


圖 11：裝置示意圖

肆、研究結果與討論

一、探針結構合成

(一) 合成 BTIC 和 BTIC-N₃

1. 合成 BTIC



圖 12：BTIC

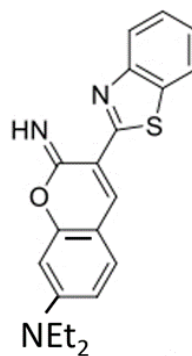


圖 13：BTIC 結構

產物為橘黃色固體，經 TLC 片確認無雜點後，使用 NMR 氫譜確認成功合成出目標產物。此反應產率為：92%

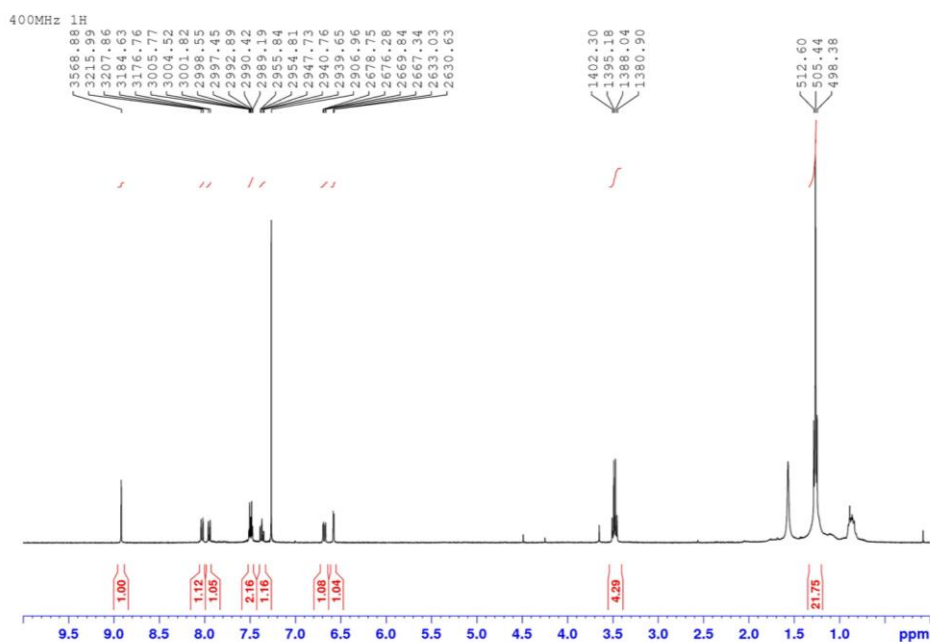


圖 14：BTIC NMR 圖譜

由以上 NMR 圖譜可看出：兩個乙基中，CH₃ 上的 6 個氫離子訊號出現在 1.25ppm 處，CH₂ 上的 4 個氫離子訊號受 N 雜原子影響出現在 3.5ppm 處。四個苯環中，共 8 個氫離子訊號皆可在 6.5ppm 至 9ppm 看見，其中包含兩支一分裂訊號，四支二分裂訊號及兩支三分裂訊號，符合自旋耦合之結果，因此確認合成出目標產物。

2. 合成 BTIC-N₃



圖 15：BTIC-N₃

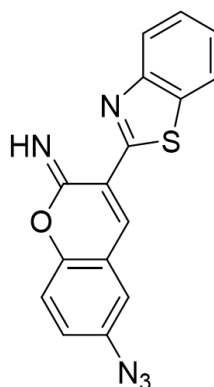


圖 16：BTIC-N₃ 結構

產物為黃色固體，經 TLC 片確認無雜點後，使用 NMR 氫譜確認成功合成出目標產物。此反應產率為：93%

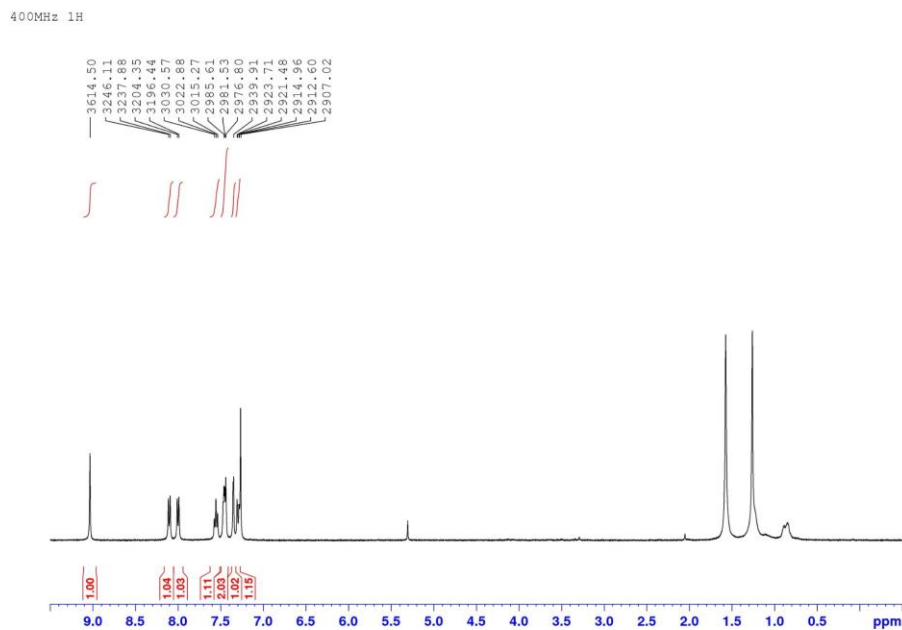


圖 17：BTIC-N3 NMR 圖譜

由以上 NMR 圖譜可看出：四個苯環中，共 8 個氫離子訊號皆可在 7.2ppm 至 9ppm 看見，其中包含兩支一分裂訊號，三支二分裂訊號(其一積分值為 2)及兩支三分裂訊號，符合自旋耦合之結果，因此確認合成出目標產物。而右方兩支訊號則分別為水及溶劑己烷。

(二) 合成側鏈結構



圖 18：側鏈



圖 19：側鏈結構

產物為透明液體，經 TLC 片確認無雜點後，使用 NMR 氫譜確認成功合成出目標產物。此反應產率為：95%

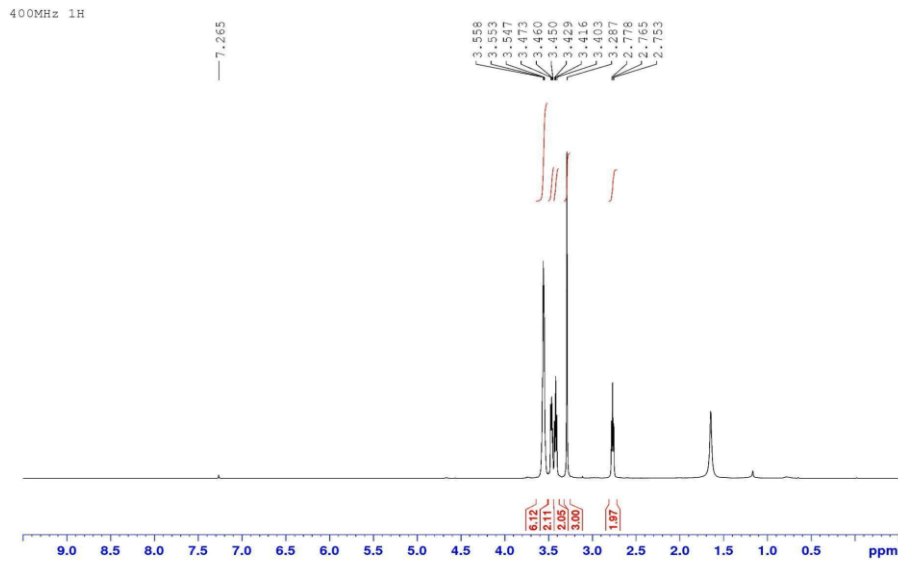


圖 20：側鏈 NMR 圖譜

由以上 NMR 圖譜可看出：長碳鏈上，共 15 個氫離子訊號皆可在 2.7ppm 至 3.6ppm 看見，且受氧原子影響而左移。而最右方的 NH₂ 的氫離子則被溶劑 CDCl₃ 置換為氘，無法偵測到訊號，因此確認有合成出目標產物。而右方的訊號則為水。

後續我們會再將此側鏈修飾上 PPH₃，如圖 9，使探針達到帶入粒線體的效果。

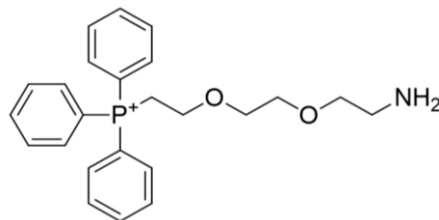


圖 21：修飾 PPH₃ 之側鏈

(三) 將螢光探針修飾上側鏈

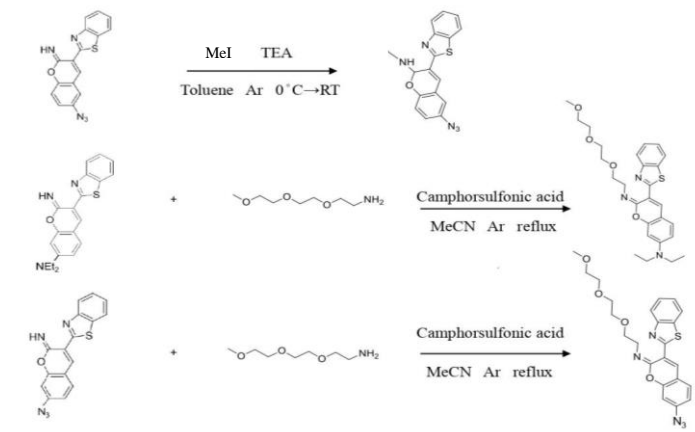


圖 22：側鏈修飾步驟

目前我們成功合成出第一個反應，也就是成功將甲基修飾上基本探針結構，雖然我們成功將較小的結構修飾上探針結構上，但在修飾上較大結構時卻遇到了困難，探針結構容易在反應過程中水解，造成當時無法修飾上側鏈。

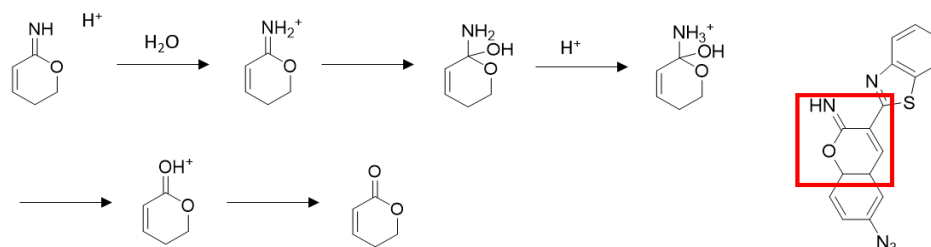


圖 23：水解機制

我們推測探針結構在反應過程中水解是因為我們在反應過程中有加酸，而水在酸性條件下可以當親合基加成在要連接側鏈的 CN 雙鍵上，導致結構水解，氨脫去，形成環內酯的結構。而我們為了使探針不水解而換了許多的反應條件，如表 1，我們換了不同的溶劑，藉由降低溶劑的含水量來使探針水解的機率降低，但反應都未成功。

	溶劑	側鏈當量	酸	酸的當量	溫度
第一次	dry EtOH	2.2	AcOH	100	80 度
第二次	Toluene	2.2	AcOH	100	80 度
第三次	dry EtOH	2.2	Camphorsulfonic acid	100	80 度
第四次	Toluene	2.2	Camphorsulfonic acid	100	80 度
第五次	dry MeCN	2.2	Camphorsulfonic acid	100	80 度
第六次	dry EtOH	1.5	Camphorsulfonic acid	0.05	80 度

表 1：反應條件

另外，我們也嘗試另一種反應途徑，如圖 24，也嘗試了兩種反應條件。

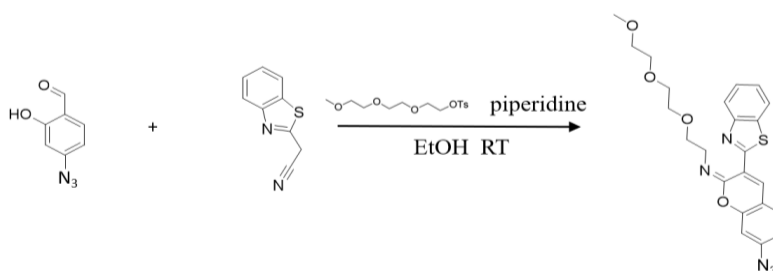


圖 24：新反應途徑

	溶劑	側鏈當量	鹼	鹼的當量	溫度
第七次	dry EtOH	2.2	piperidine	10	80 度(加側鏈後才加熱)
第八次	Toluene	2.2	piperidine	10	80 度(加側鏈後才加熱)

表 2：反應條件

經過 NMR 氫譜檢測產物後，我們發現第七次的反應條件有順利將側鏈修飾上探針。

二、性質檢測

(一) 硫化氫偵測

1. 肉眼觀測

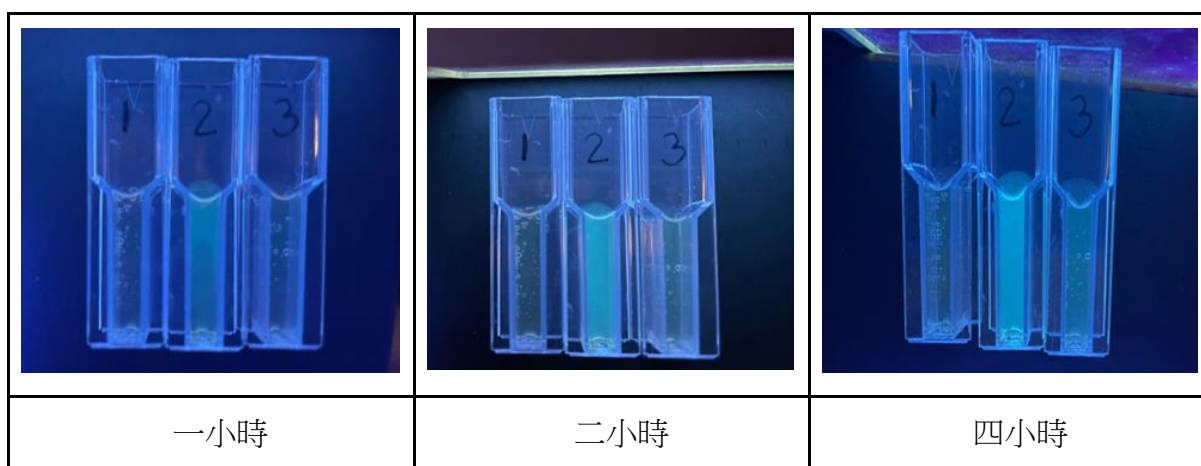


表 3：螢光測試

上表為 BTIC-N₃ 與 NaSH 反應經一小時、兩小時、四小時後，在 UV 燈照射下的發光情形。由圖可看出：

- (1) 探針、試劑濃度差 10 倍的樣品 2 經時間有產生肉眼可觀察的明顯螢光變化，因此可初步推測探針與硫化氫進行反應並產生光強度變化。
- (2) 探針、試劑濃度差 1 倍的樣品 3 在一至二小時和二至四小時皆有亮度改變，但差異不如樣品二明顯

由此二結果可推測，我們的基本探針結構可以偵測硫化氫並且有明顯肉眼可觀測的螢光變化。另外，探針和硫化氫的濃度差越大(在本檢測之 0 到 10 倍之間)，螢光強度落差越明顯。

2. 螢光光譜儀檢測

(1) BTIC-N₃

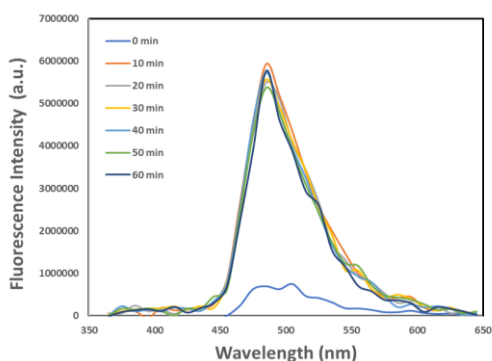


圖 25： 10^{-4} M BTIC-N₃ 與 NaSH 反應

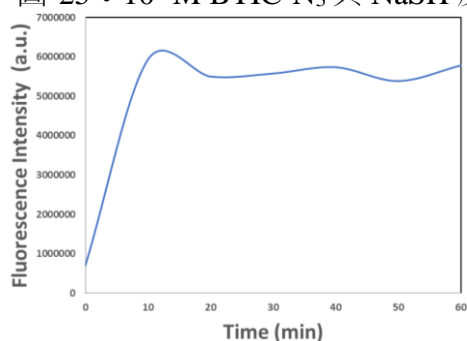


圖 27： 10^{-4} M BTIC-N₃ 螢光強度變化

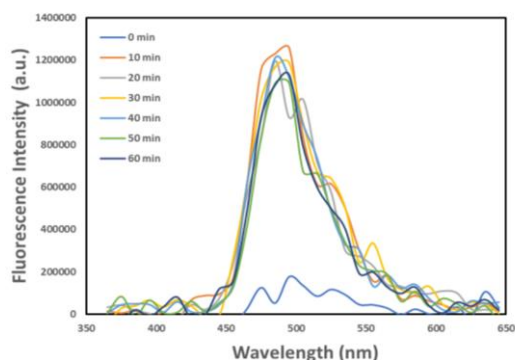


圖 26： 10^{-5} M BTIC-N₃ 與 NaSH 反應

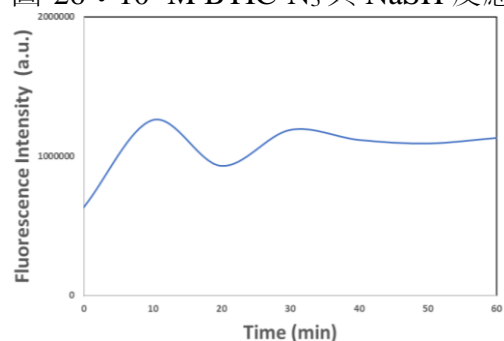


圖 28： 10^{-5} M BTIC-N₃ 螢光強度變化

上圖為 BTIC-N₃ 加入 NaSH 反應後 10 分鐘、20 分鐘、30 分鐘、40 分鐘、50 分鐘、60 分鐘利用螢光光譜儀所測定之光強度變化。從圖中可以看出光強度有隨著時間增加，與初始值比較， 10^{-4} M 組增強了 7.8 倍， 10^{-5} M 組增強了 4.8 倍，因此可以推測我們的探針有跟 NaSH 進行反應，並產生預期的光強度變化。

另外，光強度的增長大約在 10 分鐘左右停下，在 20 分鐘時光強度較 10 分鐘下降，推測是探針反應接近結束，探針開始水解造成光強度下降，偵測效果趨緩。

(2) BTIC-N₃-2

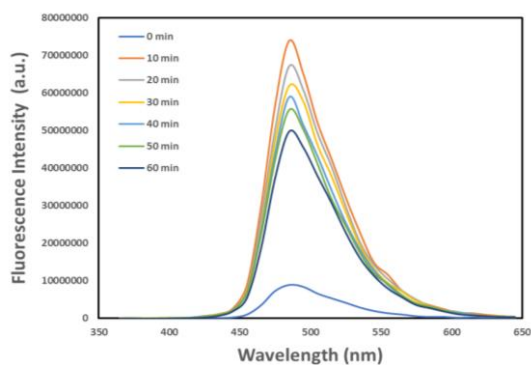


圖 29： 10^{-4} M BTIC-N₃-2 與 NaSH 反應

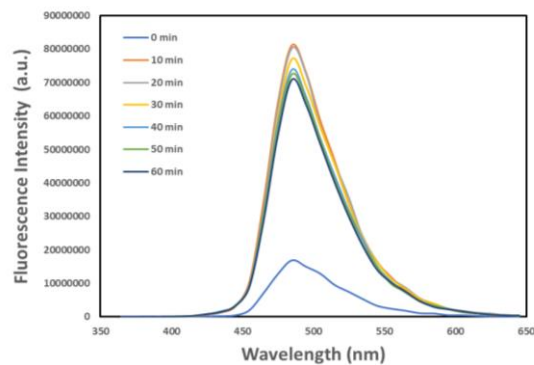


圖 30： 10^{-5} M BTIC-N₃-2 與 NaSH 反應

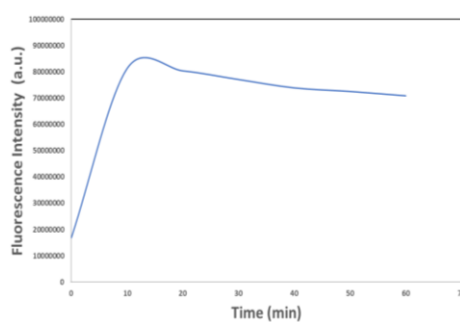
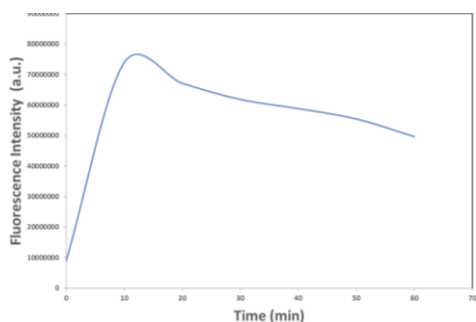


圖 31： 10^{-4}M BTIC-N₃-2 螢光強度變化 圖 32： 10^{-5}M BTIC-N₃-2 螢光強度變化

上圖為 BTIC-N₃-2 加入 NaSH 反應後 10 分鐘、20 分鐘、30 分鐘、40 分鐘、50 分鐘、60 分鐘利用螢光光譜儀所測定之光強度變化。從圖中可以看出光強度有隨著時間增加，與初始值比較， 10^{-4}M 組增強了 8.3 倍， 10^{-5}M 組增強了 7.1 倍，為四組中最高，因此可以推測我們的探針有跟 NaSH 進行反應，並產生預期的光強度變化。

另外，光強度的增長大約在 10 分鐘左右停下，在 20 分鐘時光強度較 10 分鐘下降，在後續也持續下降，推測是探針反應接近結束，探針開始水解造成光強度下降，偵測效果趨緩。

比較 BTIC-N₃ 及 BTIC-N₃-2 兩款探針，兩種濃度的 BTIC-N₃-2 探針最高螢光光強度約分別為 BTIC-N₃ 的 14 倍及 60 倍左右，由此可知 BTIC-N₃-2 的螢光效果較明顯，符合最初設計時的推測。且探針濃度為 10^{-4}M 之結果有較大的螢光差異，較有利於觀測。

(二) 選擇性測試

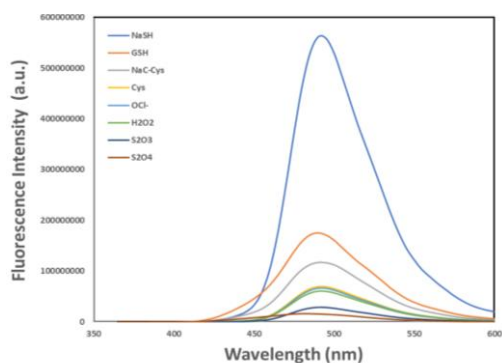


圖 33：選擇性測試

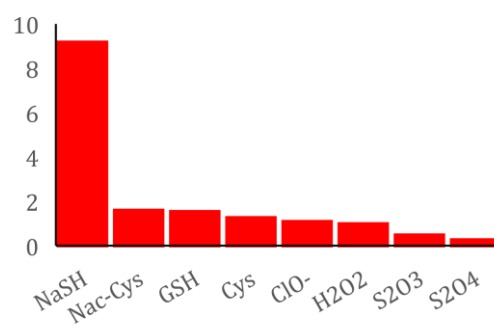


圖 34：選擇性測試

由圖可看出，探針 BTIC-N₃-2 與 NaSH 反應之螢光強度明顯高於其他生物體內常見的氧化還原劑，NaSH 組在反應 20 分鐘時達到螢光最高峰，較 0 分鐘時增強 9 倍，其餘組別僅增強 0.2 倍~1.8 倍。

由此可知，我們推測所設計並改良之探針 BTIC-N₃-2 對硫化氫具有高度選擇性。

伍、結論與應用

一、結論

- (一) 本研究設計一款新型螢光探針，應用在粒線體內硫化氫偵測，預測其具有高靈敏性和高選擇性，並且能在細胞中有良好的硫化氫偵測效果。
- (二) 本研究成功合成出 BTIC 螢光團，並將其修飾上疊氮結構。
- (三) 探針在側鏈修飾過程中容易水解，本實驗推測其水解機制並嘗試多種合成方法，成功合成出目標產物。
- (四) 利用 UV 燈及螢光光譜儀檢測後，確認基本探針結構可偵測硫化氫且有明顯螢光變化。
- (五) BTIC-N₃-2 與細胞中常見氧化劑和還原劑進行測試後，證實了其對硫化氫的高度選擇性。

二、未來展望

我們預計在合成出目前設計之螢光探針結構後，進行探針性質的檢測：持久度、靈敏度，期許我們所設計之探針相較於現有的硫化氫探針，除了高選擇性之外，也能表現出高持久度以及高靈敏度。

在完成探針的性質檢測後，我們預計將螢光團實際進行生物顯影，做多個結構顯影的比對，例如：藉由是否修飾上側鏈結構的探針，來檢測側鏈的帶入效果。最終實際將探針帶入粒線體偵測硫化氫並達到顯影效果。

陸、參考文獻

1. Jianguo Wang, Chunbin Li, Qingqing Chen, Hongfeng Li, Lihua Zhou, Xing Jiang, Mengxue Shi, Pengfei Zhang, Guoyu Jiang, and Ben Zhong Tang. (2019). An Easily Available Ratiometric Reaction-Based AIE Probe for Carbon Monoxide Light-up Imaging. 2019 American Chemical Society ACS publication.
2. Guoyu Jiang a, Chunbin Li a, Qingfang Lai b, Xiang Liu b, Qingqing Chen b, Pengfei Zhang c, Jianguo Wang a, *, Ben Zhong Tang d, *. (2021). An easily available ratiometric AIE probe for peroxyxynitrite in vitro and in vivo imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical Volume 329*.
3. Shirani, M. A., Maleki, M. H., Asadi, P., & Dinari, M. (2021). Benzothiazole Pyridine compounds: Facial synthesis, characterization, and molecular docking study on estrogen and progesterone receptors. *Journal of Molecular Structure*, 1243, 130792.

4. Ibrahim, H., Serag, A., & Farag, M. A. (2021). Emerging analytical tools for the detection of the third gasotransmitter H₂S, a comprehensive review. *Journal of Advanced Research*, 27, 137-153.
5. Hu, Q., Gao, M., Feng, G., & Liu, B. (2014). Mitochondria-Targeted Cancer Therapy Using a Light-Up Probe with Aggregation-Induced-Emission Characteristics. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(51), 14225–14229.
6. Vivian S. Lin,^{†a} Wei Chen,^{†b} Ming Xian*^b and Christopher J. Chang.(2015). Chemical probes for molecular imaging and detection of hydrogen sulfide and reactive sulfur species in biological systems. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44, 4596--4618.
7. Zhang, D., Du, J., Tang, C., Huang, Y., & Jin, H. (2017). H₂S-induced sulphydration: biological function and detection methodology. *Frontiers in pharmacology*, 8, 608.
8. Yenleng Pak, Jun Li, Kyoung Chul Ko, Gyoungmi Kim, Jin Yong Lee, and Juyoung Yoon. (2016). Mitochondria-targeted reaction based fluorescent probe for hydrogen sulfide. *Anal. Chem.* 2016, 88, 10, 5476–5481.

【評語】 050210

本研究設計一款新型螢光探針，螢光主結構選用 BTIC，以疊氮基偵測硫化氫，應用在粒線體內硫化氫偵測，使其具有高靈敏性和高選擇性，但細胞中的硫化氫偵測效果因分子還未完成而無法測試。

作品海報

設計與合成活性螢光探針應用於硫化氫之偵測

一、研究動機

醫學研究已知硫化氫參與多種生理作用，作用位置包含心血管、循環、呼吸、泌尿和神經系統等，在生物體內扮演重要角色。生物體內硫化氫濃度的異常，可能與高血壓、糖尿病和阿茨海默症等多種生理疾病的發生有關。因此，硫化氫的偵測至關重要。

目前在硫化氫的偵測尚有許多限制，例如：探針偵測時間短，多數傳統方法(比色法、電化學測定法等)會破壞細胞組織、需要繁瑣的準備過程...等。因此，我們想要設計一款螢光探針在不破壞細胞組織的前提下，藉由探針與硫化氫的反應，達到偵測硫化氫的效果。另外，也希望此螢光探針可以具備高靈敏性以及高選擇性等優勢，並且在細胞中偵測硫化氫時可以有良好的顯影效果。

我們計畫選用硫化氫濃度較高的粒線體內作為探針的偵測反應環境，因此我們設計了側鏈結構，預期可將螢光探針帶入至粒線體中並進行顯影。我們期許此研究設計之螢光探針能在粒線體中達到硫化氫顯影效果，成為一款有效的粒線體硫化氫活性螢光探針，提供未來做生物機制探討或疾病細胞篩選的應用。

二、研究目標

- (一) 設計螢光探針結構
- (二) 合成基本探針結構
- (三) 進行螢光測試，確認探針偵測硫化氫之效果
- (四) 合成並接上側鏈

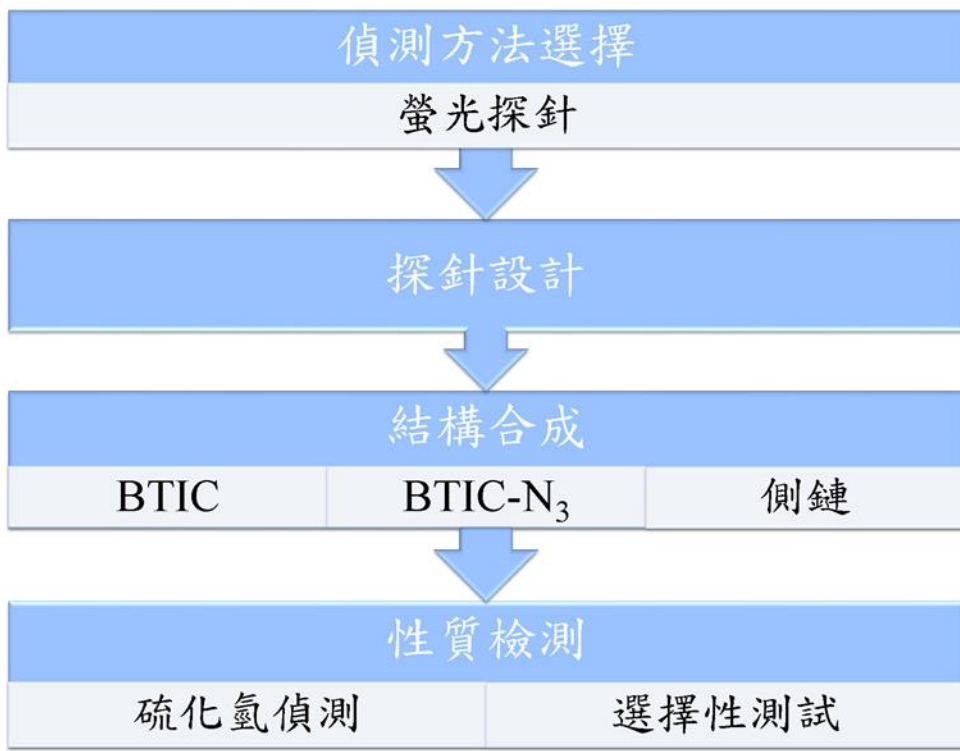
H
S S 螢光探針偵測法

優點：
• 具生物相容性
• 選擇性高
• 可實時偵測

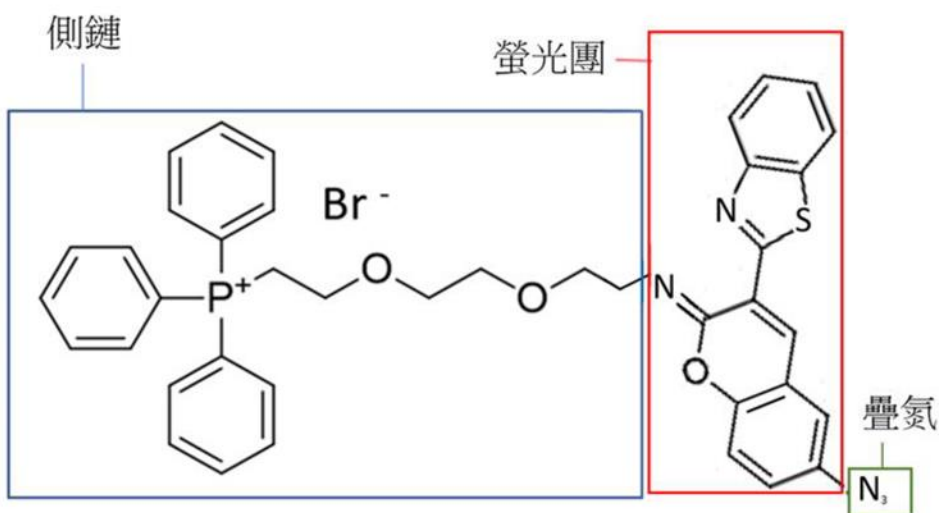
缺點：
• 難以在生物體內量化
• 可能受硫醇物質影響

三、研究方法

(一) 研究流程



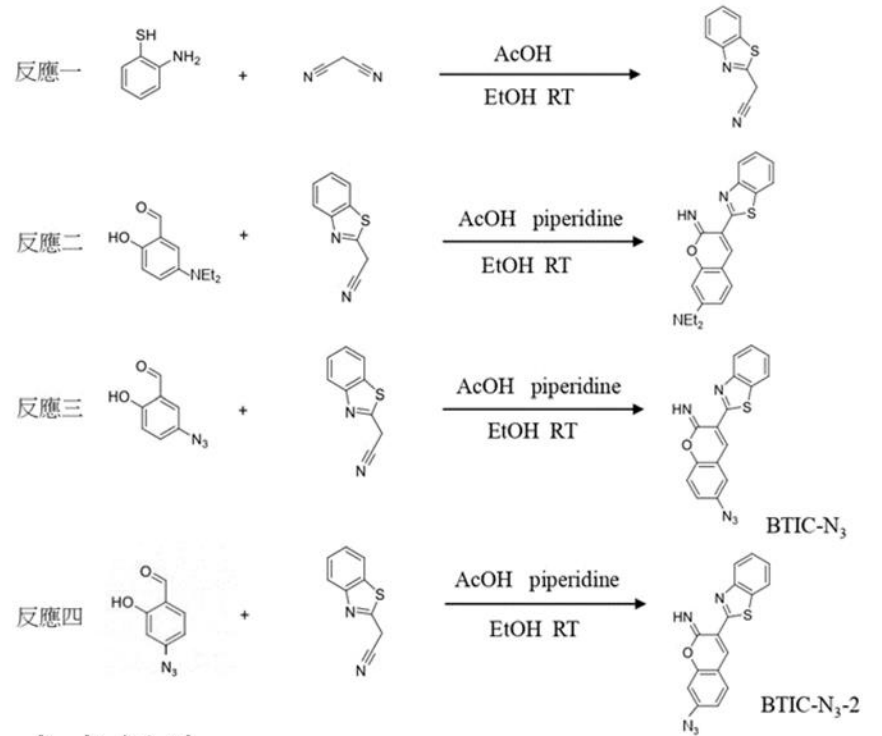
(二) 探針設計



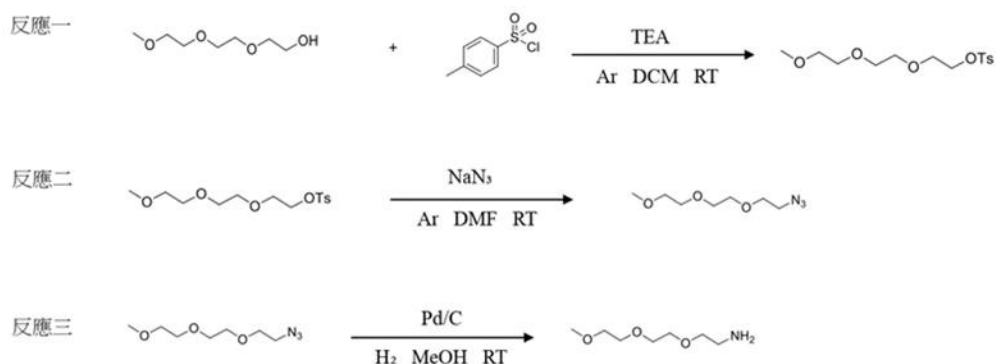
我們選用 BTIC 此結構作為探針結構的螢光團，將螢光團修飾上疊氮結構去偵測硫化氫，並利用側鏈增加探針的水溶性和連接帶正電的 PPH3，利用電位差將探針帶入粒線體中。

(三) 結構合成

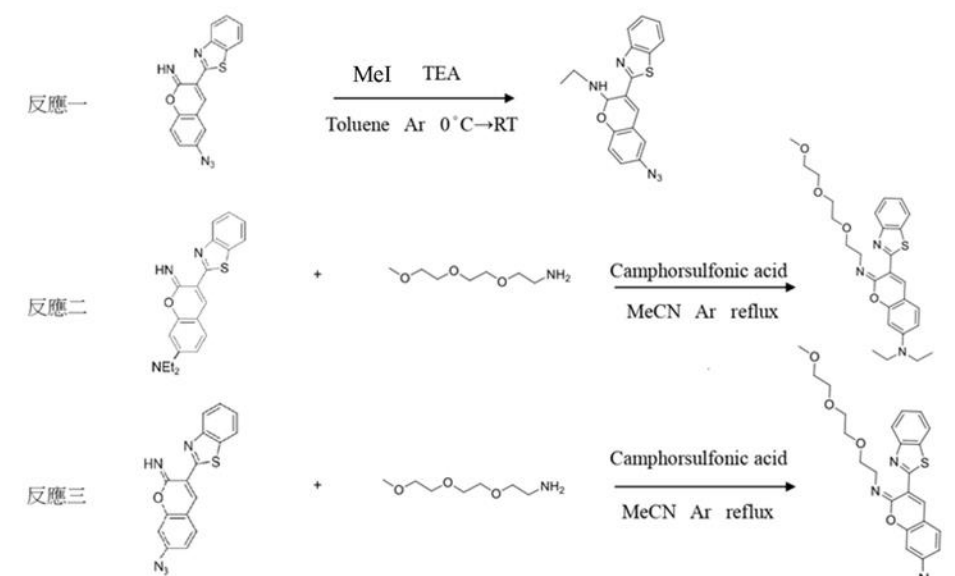
1. 合成BTIC和BTIC-N₃



2. 合成側鏈

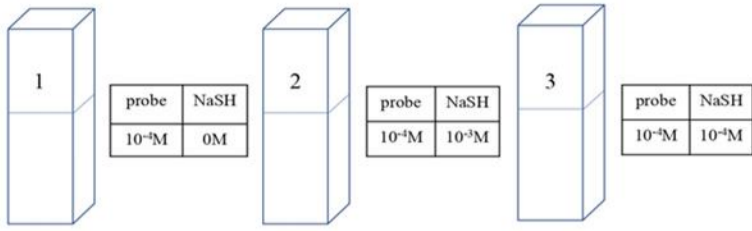


3. 接上側鏈



(四) 螢光測試

1. 初步檢測硫化氫偵測效果



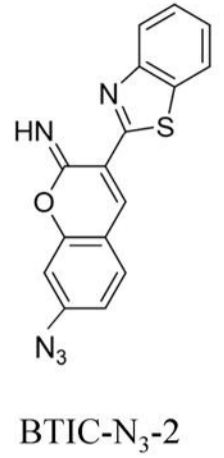
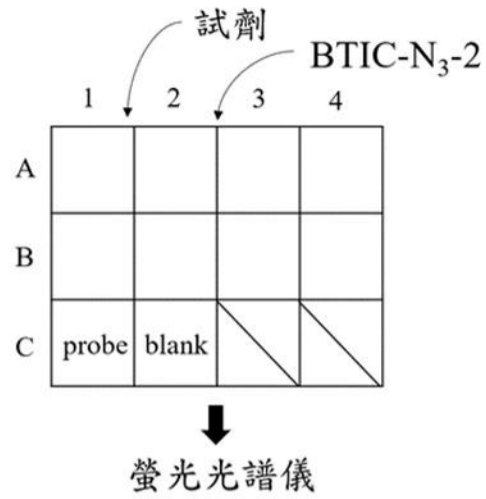
加入硫化氫至探針溶液中，在經過1、2、4小時時，將混合溶液用UV光照射，利用肉眼觀察混和溶液的螢光光強度變化，初步檢測探針對硫化氫的檢測效果。

2. 螢光光譜儀檢測硫化氫偵測效果

加入硫化氫至探針溶液中，由螢光光譜儀測定之光強度變化分析探針對於硫化氫偵測之效果。

觀測時間	10分鐘、20分鐘、30分鐘、40分鐘、50分鐘、60分鐘
探針濃度	10 ⁻⁵ M
試劑濃度	10 ⁻³ M

3. 選擇性測試

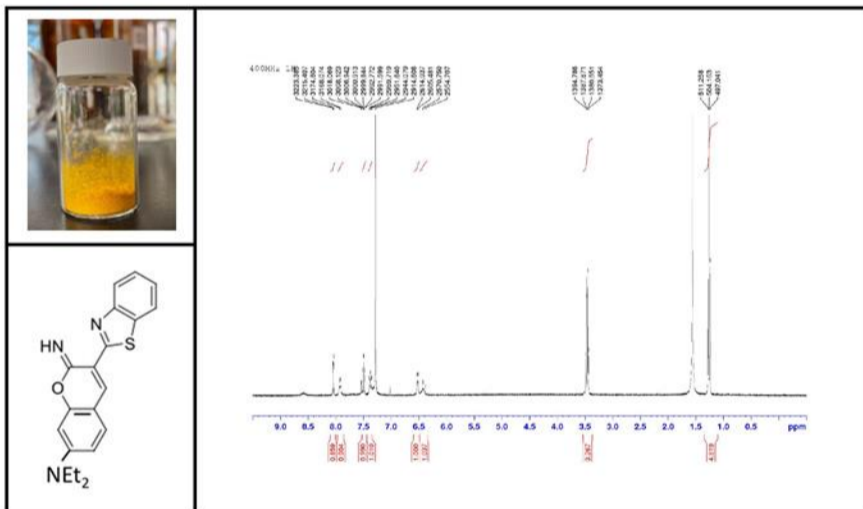


觀測時間	10分鐘、20分鐘、30分鐘、40分鐘、50分鐘、60分鐘
探針濃度	10 ⁻⁵ M
試劑濃度	10 ⁻³ M
試劑種類	NaSH、NAc-Cys、GHS、Cys、NaOCl、H ₂ O ₂ 、Na ₂ S ₂ O ₃ 、Na ₂ S ₂ O ₄

四、研究結果

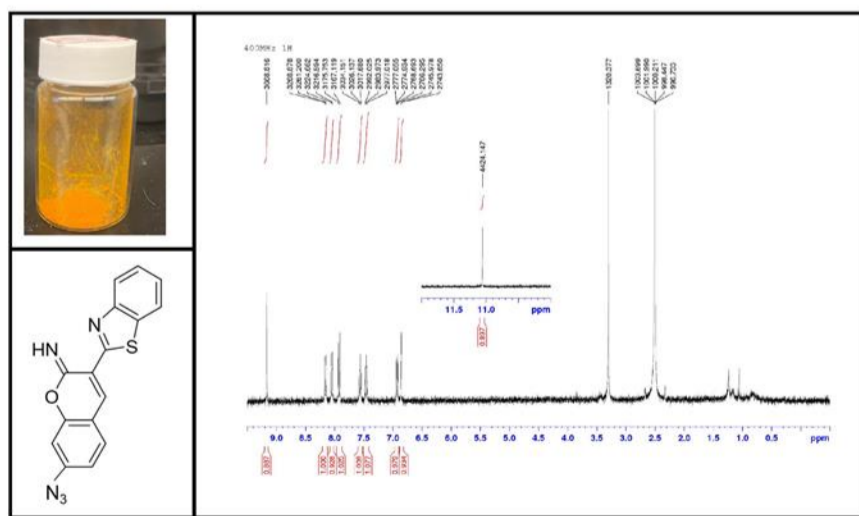
(一) 結構合成

1. 合成BTIC



此反應產率為：92%

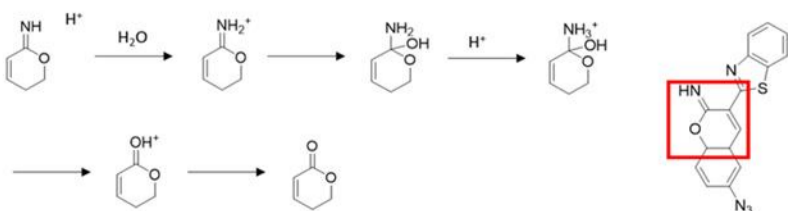
3. 合成BTIC-N₃-2



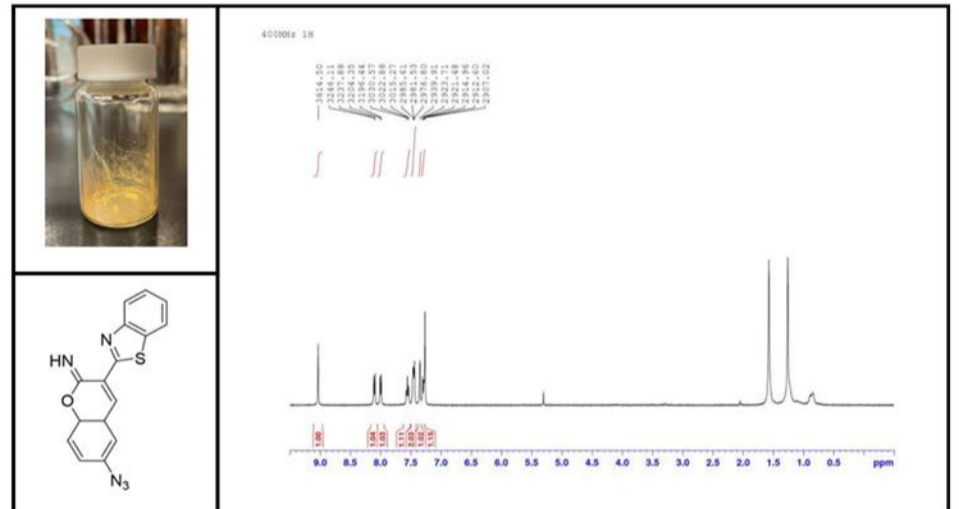
此反應產率為：91%

5. 接上側鏈

合成過程中我們發現，探針結構容易在反應過程中水解，無法修飾上側鏈。

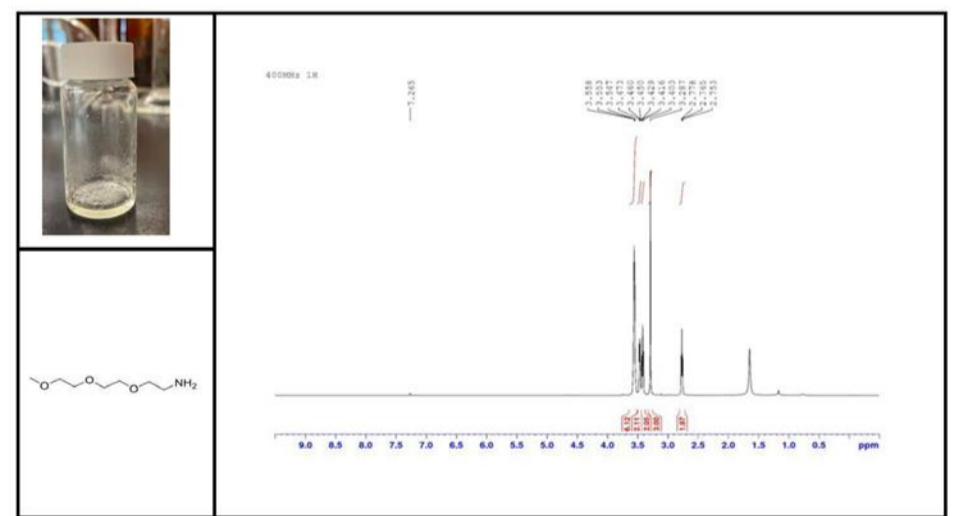


2. 合成BTIC-N₃



此反應產率為：93%

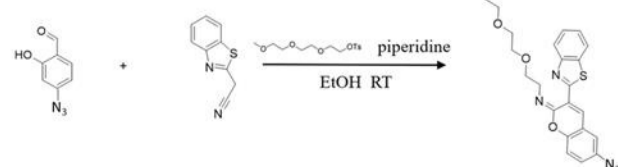
4. 合成側鏈



此反應產率為：95%

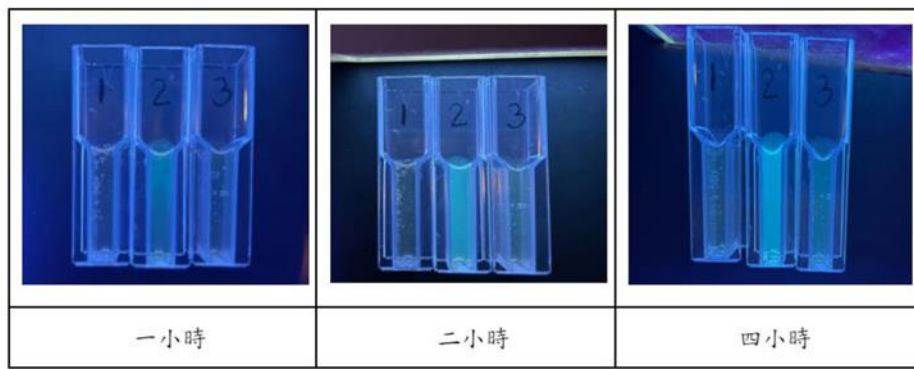
解決方法：

1. 改變溶劑和酸：降低溶劑的含水量，未成功
2. 改變反應途徑：成功修飾上側鏈

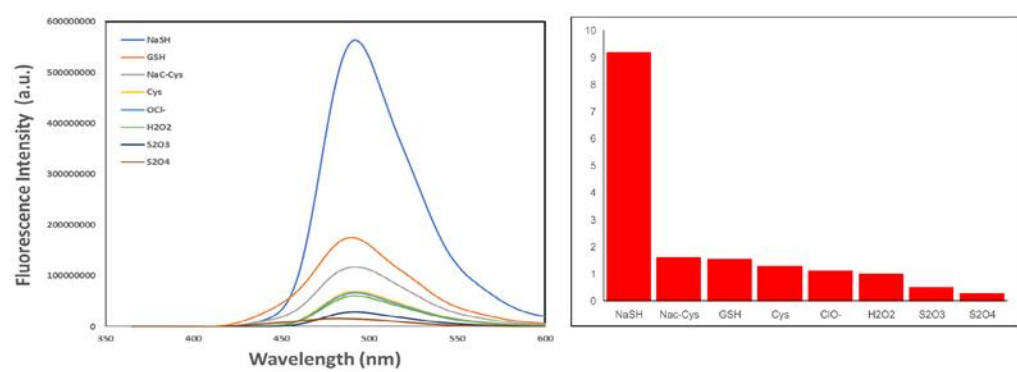


(二) 螢光測試

1. 初步硫化氫偵測

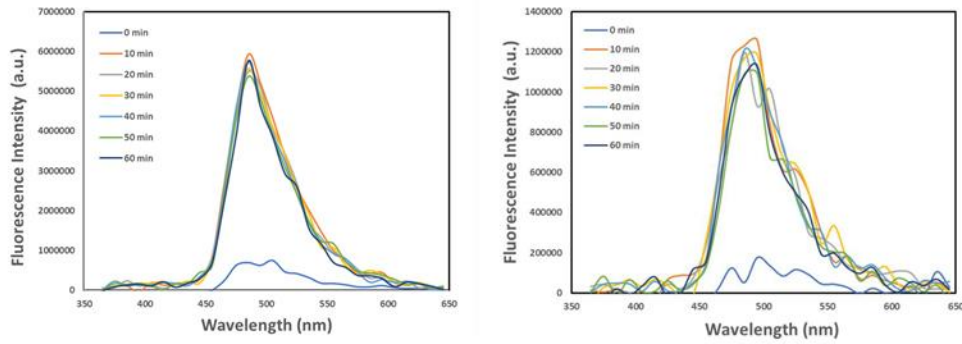


3. 選擇性測試

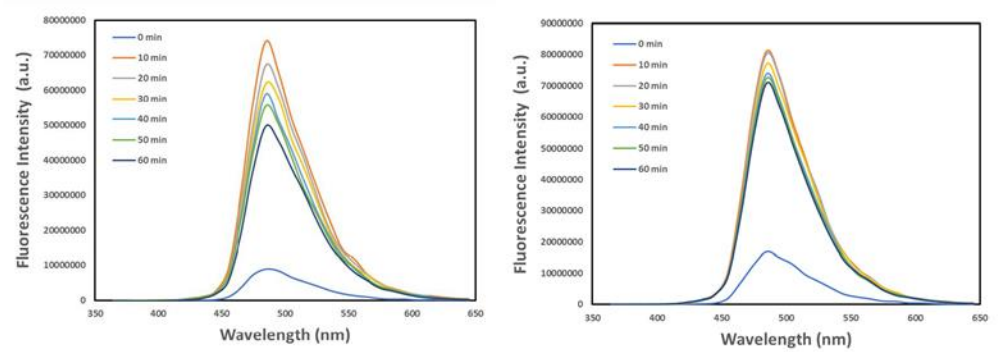


2. 螢光光譜儀檢測探針偵測硫化氫效果

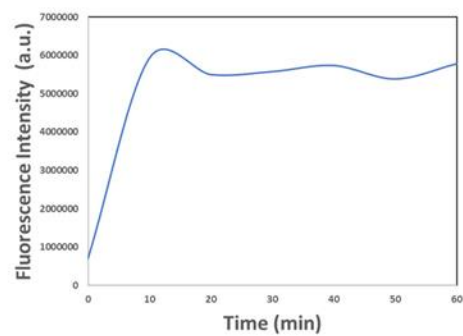
(1) BTIC-N₃



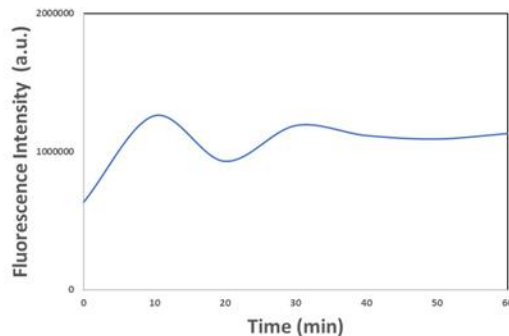
(2) BTIC-N₃-2



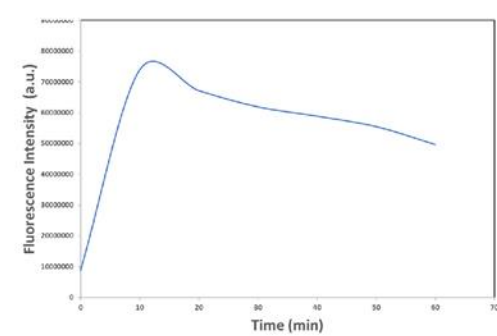
10⁻⁴M BTIC-N₃與硫化氫反應



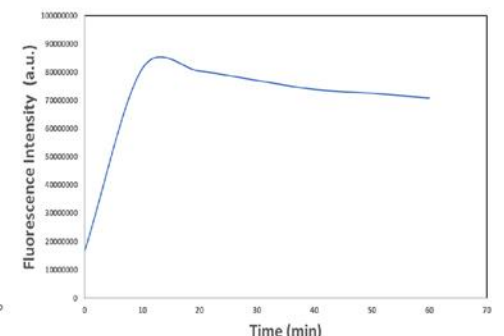
10⁻⁵M BTIC-N₃與硫化氫反應



10⁻⁴M BTIC-N₃-2與硫化氫反應



10⁻⁵M BTIC-N₃-2與硫化氫反應



五、結論

- (一) 本研究設計一款新型螢光探針，應用在粒線體內硫化氫偵測，預測其具有高靈敏性和高選擇性，並且能在細胞中有良好的硫化氫偵測效果。
- (二) 本研究成功合成出BTIC螢光團，並將其修飾上疊氮結構。
- (三) 利用UV燈及螢光光譜儀檢測後，確認基本探針結構可偵測硫化氫且有明顯螢光變化。
- (四) BTIC-N₃-2與細胞中常見氧化劑和還原劑進行測試後，證實了其對硫化氫的高度選擇性。
- (五) 探針在側鏈修飾過程中容易水解，本實驗推測其水解機制並嘗試多種合成方法，成功合成出目標產物。

六、未來展望

我們預計在合成出目前設計之螢光探針結構後，行探針性質的檢測：持久度、靈敏度，期許我們所設計之探針相較於現有的硫化氫探針，除了高選擇性之外，也能表現出高持久度以及高靈敏度。

在完成探針的性質檢測後，我們預計將螢光團實際進行生物顯影，做多個結構顯影的比對，例如：藉由是否修飾上側鏈結構的探針，來檢測側鏈的帶入效果。最終實際將探針帶入粒線體偵測硫化氫並達到顯影效果。

七、參考資料

1. Jianguo Wang, Chunbin Li, Qingqing Chen, Hongfeng Li, Lihua Zhou, Xing Jiang, Mengxue Shi, Pengfei Zhang, Guoyu Jiang, and Ben Zhong Tang. (2019). An Easily Available Ratiometric Reaction-Based AIE Probe for Carbon Monoxide Light-up Imaging. 2019 American Chemical Society ACS publication.
2. Guoyu Jiang a, Chunbin Li a, Qingfang Lai b, Xiang Liu b, Qingqing Chen b, Pengfei Zhang c, Jianguo Wang a, *, Ben Zhong Tang d, *. (2021). An easily available ratiometric AIE probe for peroxynitrite in vitro and in vivo imaging. Sensors and Actuators B: Chemical Volume 329.
3. Shirani, M. A., Maleki, M. H., Asadi, P., & Dinari, M. (2021). Benzothiazole Pyridine compounds: Facial synthesis, characterization, and molecular docking study on estrogen and progesterone receptors. Journal of Molecular Structure, 1243, 130792.
4. Ibrahim, H., Serag, A., & Farag, M. A. (2021). Emerging analytical tools for the detection of the third gas transmitter H₂S, a comprehensive review. Journal of Advanced Research, 27, 137-153.
5. Hu, Q., Gao, M., Feng, G., & Liu, B. (2014). Mitochondria-Targeted Cancer Therapy Using a Light-Up Probe with Aggregation-Induced-Emission Characteristics. Angewandte Chemie International Edition, 53(51), 14225-14229.
6. Vivian S. Lin,†a Wei Chen,†b Ming Xian*b and Christopher J. Chang.(2015). Chemical probes for molecular imaging and detection of hydrogen sulfide and reactive sulfur species in biological systems. Chem. Soc. Rev., 2015, 44, 4596-4618.
7. Zhang, D., Du, J., Tang, C., Huang, Y., & Jin, H. (2017). H₂S-induced sulfhydration: biological function and detection methodology. Frontiers in pharmacology, 8, 608.
8. Yenleng Pak, Jun Li, Kyoung Chul Ko, Gyoungmi Kim, Jin Yong Lee, and Juyoung Yoon. (2016). Mitochondria-targeted reaction based fluorescent probe for hydrogen sulfide. Anal. Chem. 2016, 88, 10, 5476-5481.