

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

二價銅離子化學偵測分子之開發及評估 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2113-M-009-014-
執行期間：97年08月01日至98年07月31日
執行單位：國立交通大學應用化學系(所)

計畫主持人：吳淑祿

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：劉士榮
碩士班研究生-兼任助理人員：黃睿裕
碩士班研究生-兼任助理人員：杜昆儒
碩士班研究生-兼任助理人員：宋益銘

處理方式：本計畫可公開查詢

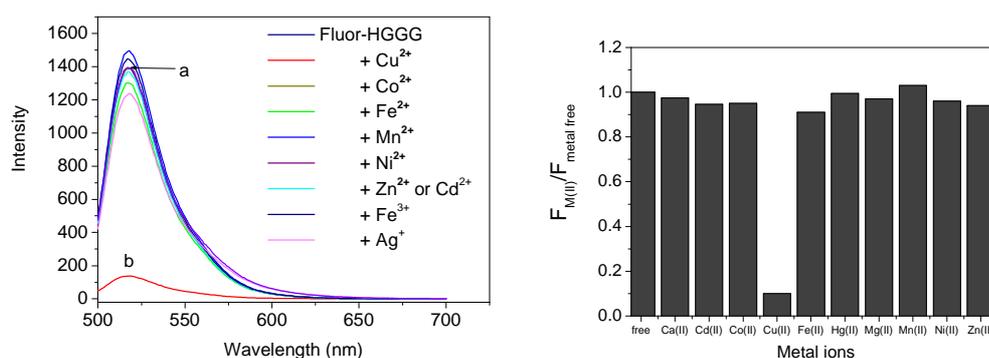
中華民國 98 年 09 月 10 日

報告內容：

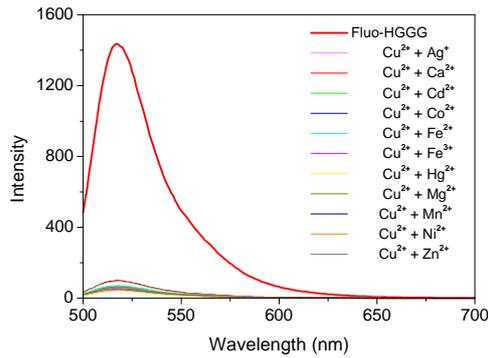
銅離子是人體中含量第三多的必要過渡金屬離子，且在各種生物系統中都扮演重要的生理角色^{1,2}。因其廣泛的用途，銅也被當作明顯金屬污染的指標。銅離子可和氧分子反應形成易反應的氧化物群(reactive oxygen species, ROS)，能對蛋白質、核酸和脂質造成傷害。銅離子對細胞的毒性已證實和嚴重神經退化性疾疾病如緬克斯症候群及威爾森氏症^{3,4}，阿茲海默症⁵及庫賈氏症⁶等有關聯。因此，不論在體外及體內均能更敏銳且更精確地偵測到 Cu^{2+} 之化學偵測分子的需求，正逐漸增加。

這個計畫主要是設計二價銅離子化學偵測分子，分別以胜肽(peptide)及萘醌(naphthoquinone)為主，用以偵測二價銅離子。計畫主要由四位碩士研究生、黃睿裕、劉士榮、杜昆儒、宋益銘完成，其結果已發表兩篇 SCI 期刊論文^{7,8}，分別敘述於下列。

以胜肽為主的化學偵測分子 **Fluor-HGGG**，使用的胜肽為 HGGG，並連接螢光團 fluoroscein。圖一為 **Fluor-HGGG** 在 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 及 Zn^{2+} 中的螢光光譜。金屬離子的濃度為 $100 \mu\text{M}$ ，較 **Fluor-HGGG** 的濃度高 100 倍 ($1.0 \mu\text{M}$)，其中只有銅離子具明顯螢光淬熄現象。有關 $F_{\text{M(II)}}/F_{\text{metal free}}$ 的比例，顯示大部分金屬之比值趨近於 1，其中例外為 Cu^{2+} ，其比值僅 0.1。此觀察說明 Cu^{2+} 是唯一立即與 **Fluor-HGGG** 形成鍵結，並引發明顯螢光淬熄現象，此顯示對 Cu^{2+} 之偵測具高度選擇性。另外， Cu^{2+} 與其他離子混合所引起的螢光淬熄現象，與 Cu^{2+} 單獨引起之螢光淬熄現象結果相似(圖二)。此結果指出，其他離子並沒有影響 Cu^{2+} 與 **Fluor-HGGG** 的鍵結。這個發現與先前其他研究中，推測 Cu^{2+} 可能是唯一能與四胜肽 HGGG 形成鍵結的金屬離子相當吻合。⁹

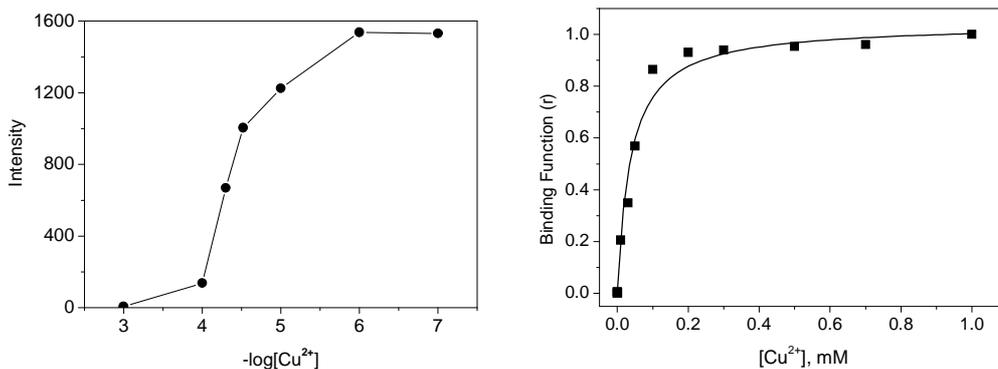


圖一. Response of chemosensor **Fluor-HGGG** to different metal ions in terms of fluorescence. (Right) The emission spectra of **Fluor-HGGG** in the presence of metal ions. (Left) The ratio $F_{\text{M(II)}}/F_{\text{metal free}}$ at 520 nm.



圖二. Fluorescent response of chemosensor **Fluor-HGGG** ($1.0 \mu\text{M}$) to Cu^{2+} ($100 \mu\text{M}$) over the selected metal ions ($100 \mu\text{M}$).

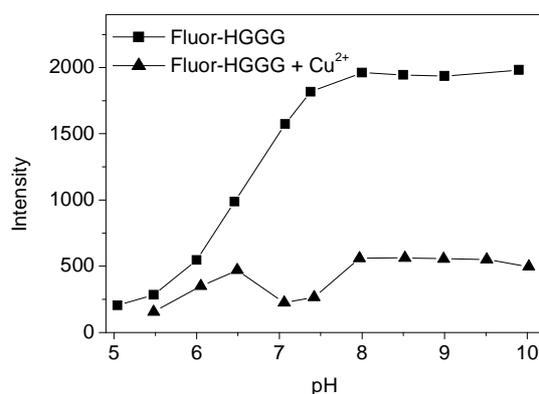
Cu^{2+} 與 HGGG 鍵結是可達到飽和的。將各種不同濃度的 Cu^{2+} 與 HGGG 混合, 並個別紀錄每個樣本之發光光譜。圖三顯示 Cu^{2+} 濃度高於 $100 \mu\text{M}$ 時, 螢光淬熄的現象達到最大值, Half-maximal binding 濃度為 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 。在 Cu^{2+} 與 prion 蛋白鍵結的研究中亦有類似的觀察。prion 蛋白在 N 端有四個八胜肽重複序列 (PHGGGWGQ), 其色胺酸 (tryptophan) 可當作 Cu^{2+} 鍵結螢光的探針。當 Cu^{2+} 濃度至少高於 prion 蛋白溶液 ($1.0 \mu\text{M}$) 時, 可觀察到明顯的螢光淬熄現象。prion 蛋白的 Half-maximal binding 濃度在 $1.4 \times 10^{-5} \text{M}$, 這與 **Fluor-HGGG** 的 Half-maximal binding 濃度 ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) 接近。prion 蛋白的四個八胜肽可共同結合一個 Cu^{2+} , 故有較低的 Half-maximal binding 濃度。**Fluor-HGGG** 對於 Cu^{2+} 之偵測極限為 $3.9 \mu\text{M}$, 表示可容許偵測 Cu^{2+} 濃度於約 10^{-6}M 。藉由分析螢光淬熄測量結果, 可以得到 Cu^{2+} 與 **Fluor-HGGG** 與 Cu^{2+} 之解離常數 (K_D), 經計算後發現為 $37 \mu\text{M}$ (圖三)。



圖三. (Right) Titration curve of fluorescence emission intensity for **Fluor-HGGG** against the negative log of Cu^{2+} concentration. (Left) Binding curve was generated from analysis of fluorescence quenching measurements.

為檢視於何種酸鹼值下 **Fluor-HGGG** 對 Cu^{2+} 之偵測效率最好, 首先針對 **Fluor-HGGG** 使用 pH 滴定法。如圖四, 螢光發光強度在 pH 範圍 5~8 之間達到頂點前會持續增加。目前已知 fluorescein 具有四種離子形式會發出螢光—陽離子、中性離子、一價陰離子及二價陰離子, 其 pK_a 分別為 2.08、4.31 及 6.43。

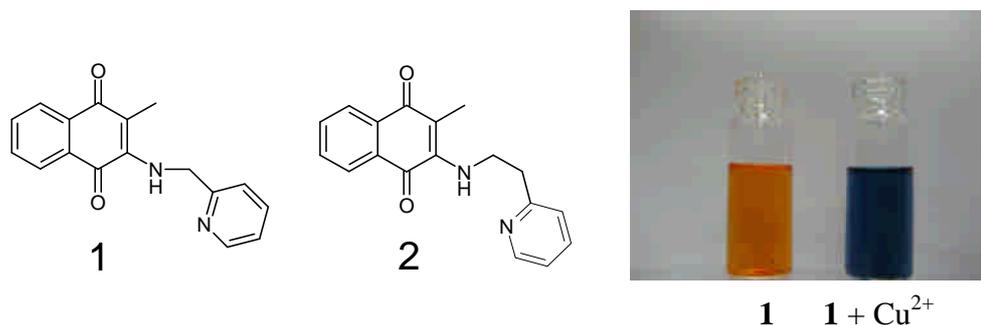
¹⁰ 其中，以二價陰離子螢光發光強度最高，一價陰離子次之，陽離子及中性離子則無螢光。此可解釋為何此系統之螢光度會在 pH > 6.5 顯著增加，pH 6.5 是二價陰離子之 pK_a 值。當 pH < 6.5 時為一價陰離子為主要成份，螢光強度較低。當 pH < 5 時螢光強度極低，故數據並無列入圖四。Cu²⁺ 和 Fluor-HGGG 鍵結對螢光強度的影響就非常顯著，在圖四中顯示當 pH > 6.5 時加入 Cu²⁺ 能引起明顯螢光淬熄現象，在 pH 值 7-7.4 螢光強度達到最低。當 pH 超過 8 時，螢光強度則略為增加。由此滴定曲線可知螢光淬熄的最佳 pH 值為 7-8，是一般細胞內的酸鹼度。已知由測量電位差(potentiometric measurement)來觀察 Cu²⁺ 及 Fluor-HGGG 鍵結的研究中，CuH₋₂L(L, Fluor-HGGG) 在 pH 6-9 時為主要成份分子。¹¹ 組胺酸咪唑被認為是 Cu²⁺ 第一結合位置，之後將其中兩個醯胺鍵去質子化。Cu²⁺ 的鍵結前，需要而將組胺酸咪唑去質子化，這就是為何會在 pH 值超過 6.5 時，才會發生螢光淬熄的現象—接近組胺酸咪唑的 pK_a 值 6.0。當 pH 超過 8 時，螢光強度會稍為增加，是因形成了新的產物 CuH₋₃L (L, Fluor-HGGG)。這是因為 pH 超過 8 時，第三個醯胺鍵會產生去質子化，當 pH > 9 時則成為主要產物 CuH₋₃L。不同的地方是，CuH₋₃L 有較強的螢光強度，這剛好可解釋為何在 pH 8 時發光強度會有些微變化。



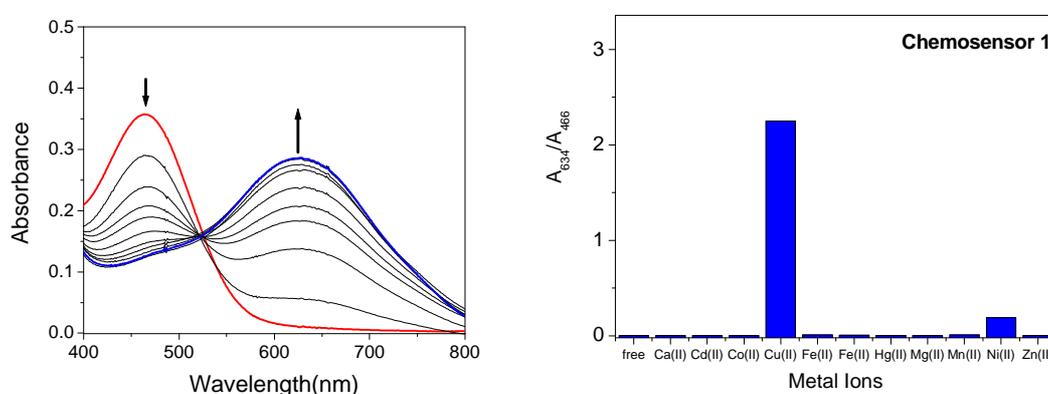
圖四. Influence of pH on the fluorescence spectra for **Fluor-HGGG** (1.0 μ M) both when pure and in combination with Cu²⁺ (100 μ M). The excitation wavelength was 490 nm, and the monitored emission wavelength was 520 nm.

第二部份，主要設計以茶酚醌為主的化學偵測分子 1 及 2(圖五)，來研究和金屬離子形成錯化合物的能力。金屬離子 Ca²⁺、Cd²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Hg²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Ni²⁺ 及 Zn²⁺ 等，均用來測試是否能以化學感測器 1 和 2 來偵測。Cu²⁺ 是唯一明顯肉眼可見顏色改變的離子，化學感測器 1 和 2 的顏色均從橘色轉為深藍色(圖五)。圖五，顯示 Cu²⁺ 和化學感測器 1 滴定時吸收度的改變。當 Cu²⁺ 濃度逐漸增加時，在 466 nm 的吸收度降低，且會在 634 nm 形成一新的吸收帶。如此 168 nm 的紅位移，會造成顏色從橘色變為深藍色。圖六，為化學感測器 1 在各種不同金屬離子下的吸收比例(A₆₃₄/A₄₆₆)。對化學感測器 1 和 2 來說，Cu²⁺ 都是唯

一有高比值(A_{634}/A_{466})的離子。化學感測器 1 和 2，都展現對 Cu^{2+} 偵測上的高精確性。

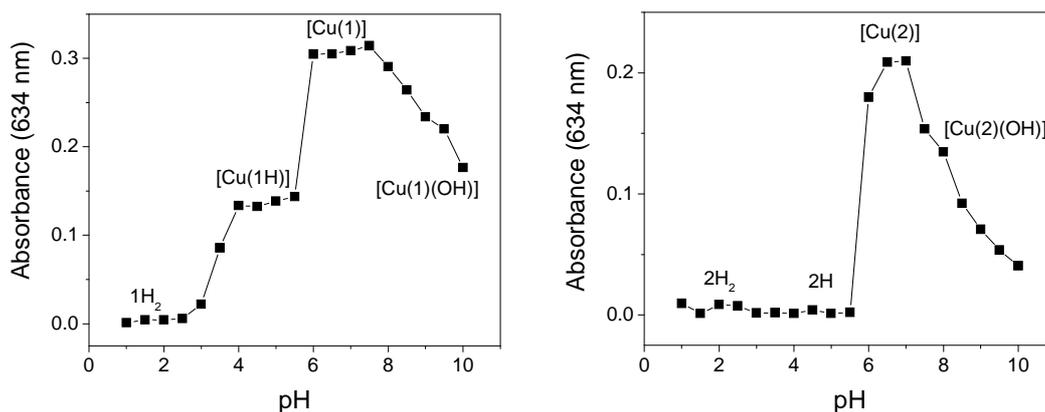


圖五. (Right) Molecular structures of chemosensors 1 and 2. (Left) The colors of chemosensor 1 (100 μM) and its mixture with Cu^{2+} (500 μM) in the methanol-water (v/v = 4/1, 20 mM HEPES buffer, pH 7.0) solution.



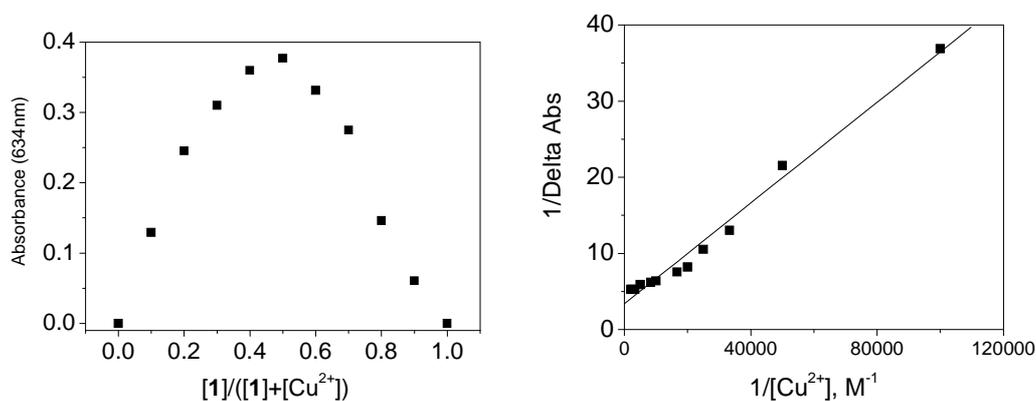
圖六. (Right) Absorption change in the UV/Vis spectra of 1 (red line, 100 μM) upon $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2$ titration in a methanol-water solution. (Left) Spectrophotometric response of 1 with different metal ions.

我們亦使用 UV-vis 光譜來偵測 pH 值的改變對 Cu^{2+} 及化學感測器 1 和 2 鍵結的影響(圖七)。波長 634 nm 代表藍色錯化合物。在 pH 6.0 時，634 nm 之吸收度突然增加，並在 pH 6.0–7.5 時達到最大值。此結果表示，形成藍色的 1- Cu^{2+} 及 2- Cu^{2+} 錯化合物是一種去質子化的過程。當 pH 值大於 8 時，634 nm 之吸收度會逐漸降低。這是因為 1- Cu^{2+} 及 2- Cu^{2+} 錯化合物開始解離，故造成此結果。以化學感測器 1 來說，在 pH 4–5.5 吸收度會出現平原區(吸收度=0.1)。此結果顯示了非去質子化 1- Cu^{2+} 錯化合物的出現。在 pH<4 時，吸收度趨近於零。1- Cu^{2+} 及 2- Cu^{2+} 錯化合物在此酸鹼度範圍下不存在。



圖七. pH titration of Cu(II) binding with chemosensor **1** (top) and **2** (bottom). **1** or **2** (10^{-4} M) was mixed with metal ions (5×10^{-4} M) in a methanol-water (v/v = 4/1, 20 mM buffer) solution.

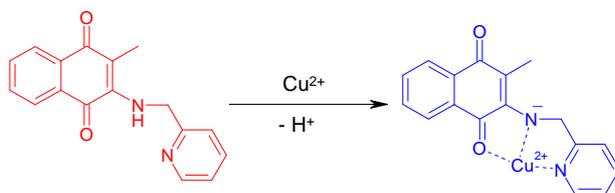
我們使用 job's plot 實驗來決定 $1-Cu^{2+}$ 及 $2-Cu^{2+}$ 錯化合物鍵結比例。在圖八中，在相同整體濃度下，以 634nm 的吸收度對化學感測器 **1** 和 **2** 的莫爾比例來繪圖。結果顯示，在 $1-Cu^{2+}$ 及 $2-Cu^{2+}$ 錯化合物在莫爾比例 0.5 時到達最大吸收度。這表示 $1-Cu^{2+}$ 及 $2-Cu^{2+}$ 錯化合物的比例為 1:1。 $1-Cu^{2+}$ 及 $2-Cu^{2+}$ 錯化合物的結合常數 K_a ，藉由透過繪製 $1/\Delta A$ 及 $1/[Cu^{2+}]$ 之圖表，並根據 Benesi-Hildebrand 方程式求得。¹² $1-Cu^{2+}$ 及 $2-Cu^{2+}$ 錯化合物之 K_a 值分別約為 $1.02 \pm 0.04 \times 10^4 M^{-1}$ 及 $8.50 \pm 0.18 \times 10^3 M^{-1}$ 。化學感測器 **1** 之結合常數較化學感測器 **2** 稍高一些。



圖八. (Right) Job's plot of a 1:1 complex of $1-Cu^{2+}$, where the absorbance at 634 nm was plotted against the mole fraction of Cu^{2+} at a constant total concentration of 2.0×10^{-4} M in methanol. (Left) Benesi-Hildebrand plot of **1** with $Cu(BF_4)_2$.

為進一步探究 $1-Cu^{2+}$ 錯化合物之結構，我們使用 IR 光譜來獲得 Cu^{2+} 在化學感測器 **1** 內的鍵結狀態。IR 光譜主要特性在位於羰基的吸收峰 (1672 cm^{-1})，和兩個羰基在結構中呈不對稱伸展有關。當 Cu^{2+} 和化學感測器 **1** 結合時會促使吸收峰帶從 1672 cm^{-1} 降至 1644 cm^{-1} 。此現象說明 Cu^{2+} 在 C=O 鍵結間直接作用，新鍵結

在 Cu^{2+} 與 $\text{C}=\text{O}$ 之氧原子形成。化學感測器 **1** 之作用類似三芽基團， Cu^{2+} 與兩個氮原子和 1,4-萘醌中的一個氧原子形成鍵結(圖九)。此模型與先前實驗結果中， Cu^{2+} 和化學感測器 **1** 和 **2** 形成錯化合物比例約為 1:1 相符。



圖九. The bonding model of the **1**- Cu^{2+} complex.

結論:

這個計畫主要是設計二價銅離子化學偵測分子，分別以胜肽(peptide)及萘醌(naphthoquinone)為主，用以偵測二價銅離子。所設計的化學偵測分子 **Fluor-HGGG**、**1** 及 **2**，皆能夠偵測二價銅離子，對於其它金屬離子則沒有反應，具有高度的專一性。以上的研究已發表於兩篇 SCI 期刊論文^{7,8}，後續相關的研究(二價銅離子化學偵測分子)，將繼續於下個年度國科會計畫持續進行。

參考文獻:

1. J. J. R. Frausto da Silva, R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry of Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, Clarendon Press: Oxford, **1993**, pp. 388-397.
2. J. A. Cowan, *Inorganic Biochemistry: An Introduction*, Wiley-VCH, New York, **1997**, pp. 133-134.
3. D. J. Waggoner, T. B. Bartnikas, J. D. Gitlin, *Neurobiol. Disease*, **1999**, *6*, 221-230.
4. C. Vulpe, B. Levinson, S. Whitney, S. Packman, J. Gitschier, *Nat. Genet.* **1993**, *3*, 7-13.
5. P. C. Bull, G. R. Thomas, J. M. Rommens, J. R. Forbes, D. W. Cox, *Nat. Genet.* **1993**, *5*, 327-337.
6. K. J. Barnham, C. L. Masters, A. I. Bush, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2004**, *3*, 205-214.
7. Shu-Pao Wu, Shi-Rong Liu, "A new water-soluble fluorescent Cu(II) chemosensor based on tetrapeptide histidyl-glycyl-glycyl-glycine (HGGG)." *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2009**, *141*, 187-191.
8. Shu-Pao Wu, Ray-Yui Huang, Kun-Ju Du, "Colorimetric sensing of Cu(II) by 2-methyl-3-[(pyridin-2-ylmethyl)-amino]-1,4-naphthoquinone: Cu(II) induced deprotonation of NH responsible for color changes." *Dalton Transactions*, **2009**, 4735-4740.
9. J. Stockel, J. Safar, A. C. Wallace, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 7185-7193.

10. R. Sjoback, J. Nygren, M. Kubista, *Spectro. Acta, A*, **1995**, *51*, L7-L21.
11. M. Luczkowski, H. Kozlowski, M. Stawikowski, K. Rolka, E. Gaggelli, D. Valensin, G. Valensi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 2269-2274.
12. Kao, T.; Wang, C.; Pan, Y.; Shiao, Y.; Yen, J.; Shu, C.; Lee, G.; Peng, S.; Chung, W. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2919-2920.