



(21)申請案號：102149013

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 12 月 30 日

(51)Int. Cl. : C07C311/44 (2006.01)

G01N33/52 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：王雲銘 WANG, YUN MING (TW)；林谷奎 LIN, KU KUEI (TW)

(74)代理人：高玉駿；楊祺雄

(56)參考文獻：

Romero, María J., et al. "Versatile coordination behaviour of an asymmetric half-salen ligand bearing a dansyl fluorophore." Dalton Transactions 41.35 (2012): 10832-10844. 【摘要；Scheme1；圖 3-5；第 10833 頁 左欄 第 3 段】

審查人員：蔡雨靜

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：8 共 33 頁

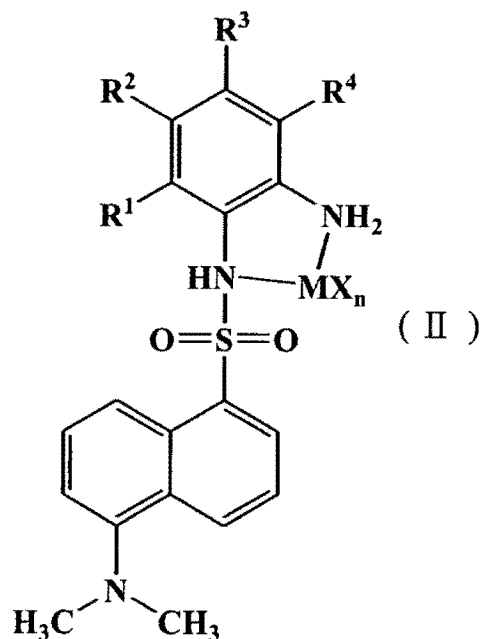
(54)名稱

丹磺醯衍生物之錯合物及其製法與應用

COMPLEX OF DANSYL DERIVATIVE, PREPARATION AND APPLICATION THEREOF

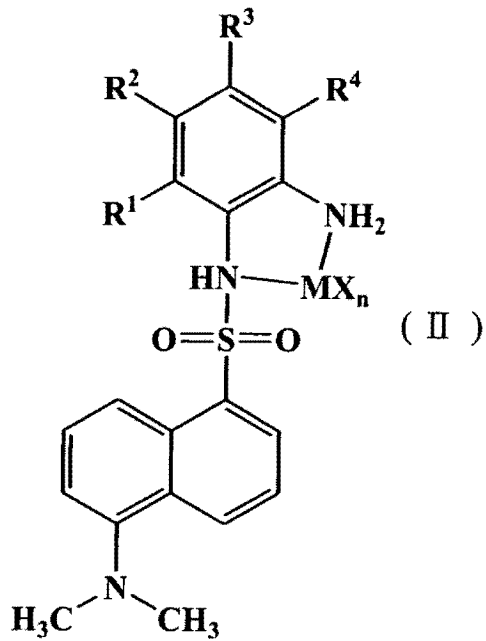
(57)摘要

一種丹磺醯衍生物之錯合物，是由下式(II)所示：



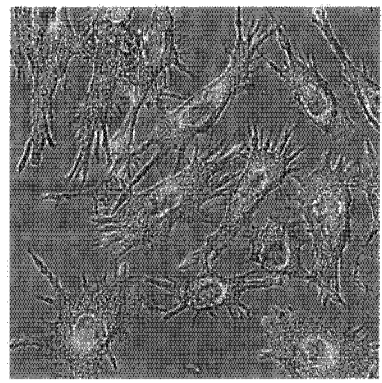
於式(II)中，M、X、n及R¹至R⁴的定義如說明書所述。本發明亦提供一種偵測一分析物中之過氧亞硝酸根離子的方法，包含使該分析物與一丹磺醯衍生物或該丹磺醯衍生物之錯合物反應，並量測所產生的螢光強度。本發明丹磺醯衍生物之錯合物可藉由量測螢光強度快速並專一性地偵測過氧亞硝酸根離子，且其不具有細胞毒性，並能有效偵測細胞中的過氧亞硝酸根離子。

A complex of dansyl derivative represented by the following formula (II):



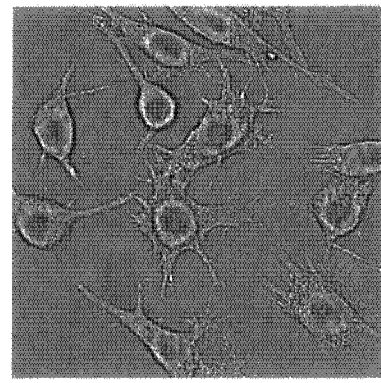
, wherein M , X , n and R^1 to R^4 are defined as described in the specification. The present invention also provides a method of detecting an analyte containing peroxy nitrite ion. The method comprises reacting the analyte with a dansyl derivative or the complex of dansyl derivative, and measuring the fluorescent intensity. The complex of dansyl derivative can rapidly and specifically detect peroxy nitrite ion. The complex exhibits low cytotoxicity, and can detect peroxy nitrite ion in living cells effectively.

LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) +
PMA (10 nM) +



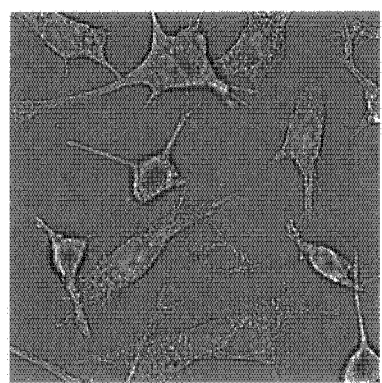
實驗組

-
-



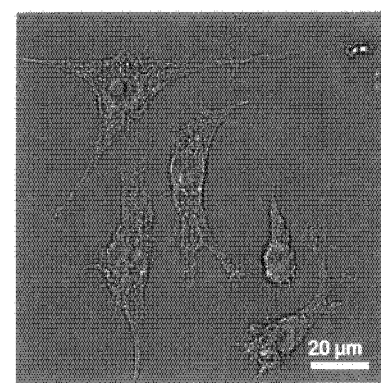
對照組 1

LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) +
PMA (10 nM) +
TEMPO (100 μM) +
胺胍(1 mM) -



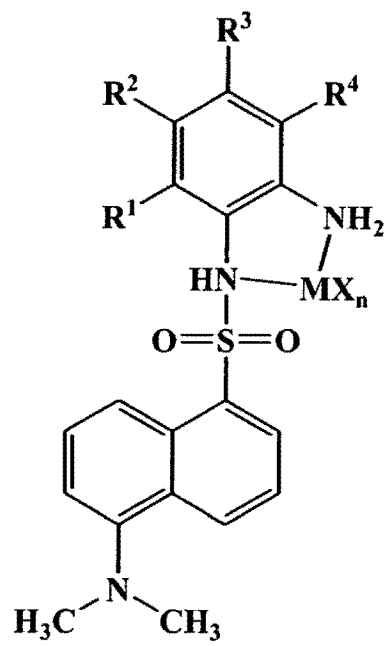
對照組 2

+
+
-
+



對照組 3

圖 8



公告本

發明摘要

※ 申請案號：102-149013
 ※ 申請日：102 12 30

C07C311/44 (2006.01)

G01N33/52 (2006.01)

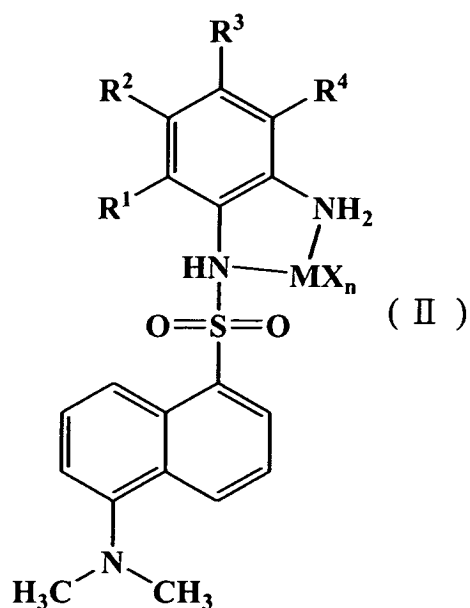
※IPC 分類：

【發明名稱】丹磺醯衍生物之錯合物及其製法與應用

Complex of dansyl derivative, preparation and application thereof

【中文】

一種丹磺醯衍生物之錯合物，是由下式(II)所示：

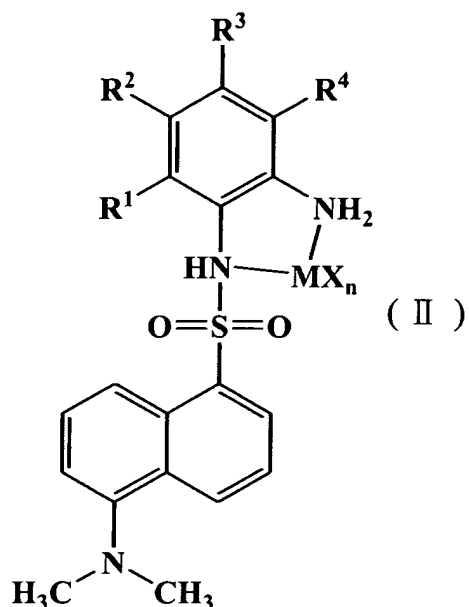


於式(II)中，M、X、n及R¹至R⁴的定義如說明書所述。本發明亦提供一種偵測一分析物中之過氧亞硝酸根離子的方法，包含使該分析物與一丹磺醯衍生物或該丹磺醯衍生物之錯合物反應，並量測所產生的螢光強度。本發明丹磺醯衍生物之錯合物可藉由量測螢光強度快速並專一性地偵測過氧亞硝酸根離子，且其不具有細胞毒性，並能有效偵

測細胞中的過氧亞硝酸根離子。

【英文】

A complex of dansyl derivative represented by the following formula (II):



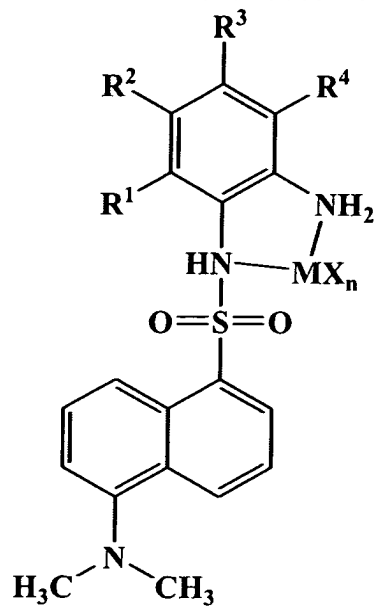
, wherein M , X , n and R^1 to R^4 are defined as described in the specification. The present invention also provides a method of detecting an analyte containing peroxy nitrite ion. The method comprises reacting the analyte with a dansyl derivative or the complex of dansyl derivative, and measuring the fluorescent intensity. The complex of dansyl derivative can rapidly and specifically detect peroxy nitrite ion. The complex exhibits low cytotoxicity, and can detect peroxy nitrite ion in living cells effectively.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 8。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



(M、X、n 及 R^1 至 R^4 的定義如說明書所述)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 丹磺醯衍生物之錯合物及其製法與應用

Complex of dansyl derivative, preparation and application thereof

【技術領域】

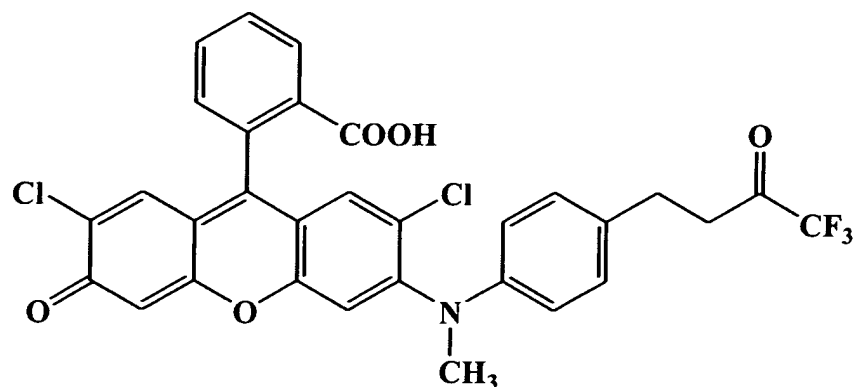
【0001】 本發明是有關於一種錯合物，特別是指一種丹磺醯衍生物(dansyl derivative)之錯合物及其製法與偵測過氧亞硝酸根離子(peroxynitrite ion)的應用。

【先前技術】

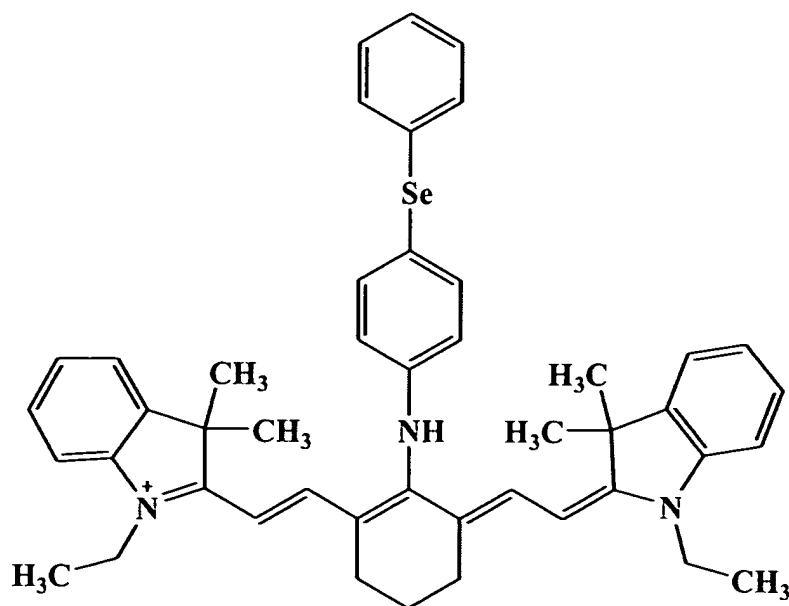
【0002】 在生理環境下[例如肺泡巨噬細胞(alveolar macrophage)]，過氧亞硝酸根離子(ONOO^-)可由一氧化氮($\cdot\text{NO}$)及超氧根離子(superoxide ion, $\cdot\text{O}_2^-$)生成，過氧亞硝酸根離子既是強氧化劑也是硝化試劑，其在許多生理反應上扮演著重要的角色，特別是其與許多慢性疾病或生理病變具有正向關係，因此在活體內(例如細胞)偵測過氧亞硝酸根離子，對於醫學診斷及治療上皆有相當助益。

【0003】 2010年，Dan Yang和Tao Peng在*Org. Lett.*, **2010**, *12*, 4932-4935中揭示一種如下所示的有機化合物，藉由過氧亞硝酸根離子打斷氮原子與苯環間的共價鍵，可用來偵測過氧亞硝酸根離子，然而，該有機化合物之合成步驟相當複雜，且羥根自由基($\cdot\text{OH}$)及次氯酸根離子(OCl^-)均會與該化合物反應並造成螢光訊號上升，進而干擾該有

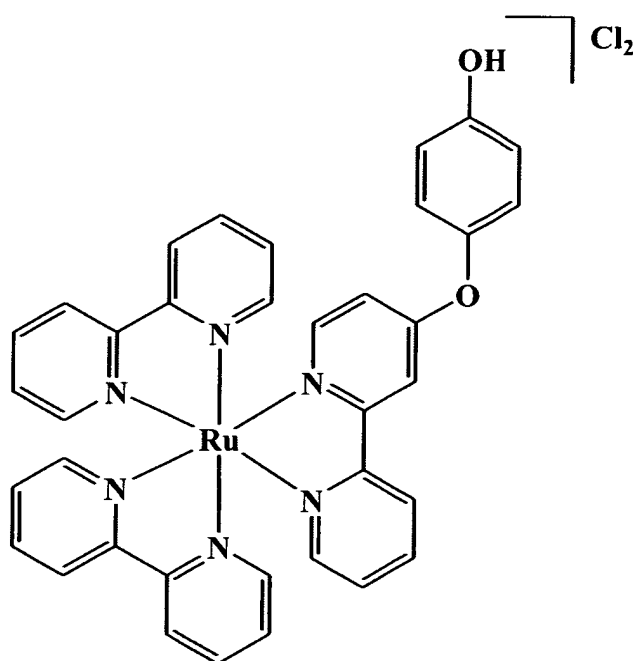
機化合物針對過氧亞硝酸根離子的偵測。



【0004】 2011 年，Keli Han 等人在 *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 11030-11033 中揭示一種如下所示的含硒化合物，藉由過氧亞硝酸根離子氧化硒原子抑制光誘導電子轉移 (photoinduced electron transfer, PET)，可用來偵測過氧亞硝酸根離子，然而，此含硒化合物與過氧亞硝酸根離子反應需經過約 10 分鐘方能使螢光訊號達到最大值，難以藉此獲得過氧亞硝酸根離子之即時螢光影像。此外，該化合物與前述由 Dan Yang 等人所發表的有機化合物類似，一樣會受到羥根自由基 ($\cdot\text{OH}$) 及次氯酸根離子 (OCl^-) 的干擾，無法準確判定螢光訊號是來自於過氧亞硝酸根離子。



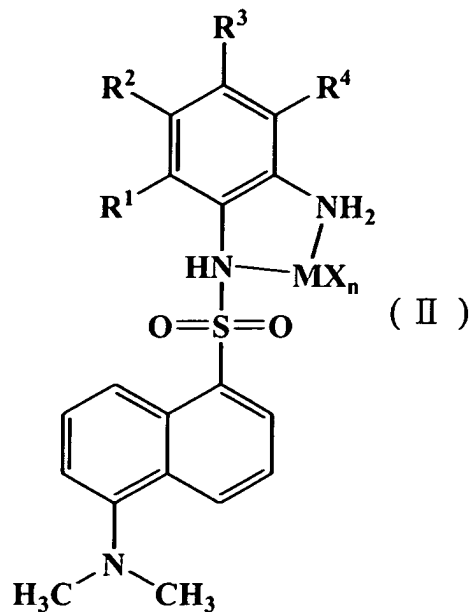
【0005】 2012 年，Jiasheng Wu 等人在 *Spectrochimica Acta Part A*, 2012, 94, 340-345 中揭示一種如下所示的含鈦化合物，藉由過氧亞硝酸根離子斷裂聯吡啶(bipyridine)上的對苯二酚(hydroquinone)官能基，可用來偵測過氧亞硝酸根離子，然而，此含鈦化合物是藉由其與過氧亞硝酸根離子反應後會造成螢光訊號的淬滅(quench)，而此偵測方法不如一般利用產生螢光的方式來得直觀及容易觀察。



【發明內容】

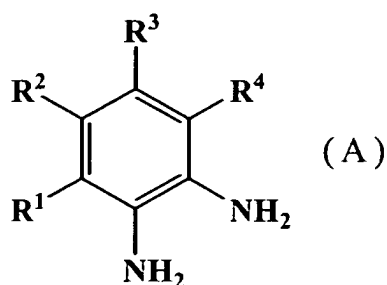
【0006】 因此，本發明之第一目的即在提供一種丹磺醯衍生物之錯合物，除了能在短時間內偵測過氧亞硝酸根離子外，且具有針對過氧亞硝酸根離子的專一性，能避免其他反應性含氧物種(reactive oxygen species, ROS)及反應性含氮物種(reactive nitrogen species, RNS)的干擾。

【0007】 於是本發明丹磺醯衍生物之錯合物，是由下式(II)所示：



【0008】 其中，**M** 表示一金屬離子；**X** 表示一陰離子；**n** 表示 1 至 2；及 **R¹** 至 **R⁴** 為相同或不同，且分別地表示氫、甲基或乙基。

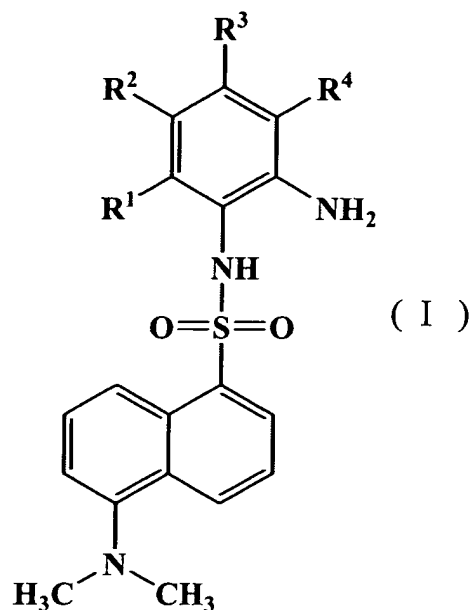
【0009】 本發明之第二目的即在提供一種丹磺醯衍生物之錯合物的製法，包含：在一鹼的催化下，使丹磺醯氯 (dansyl chloride) 與由下式 (A) 所示的二胺苯反應，接著再與一金屬鹽 **MX_n** 進行錯合反應：



【0010】 其中，**M** 表示一金屬離子；**X** 表示一陰離子；**n** 表示 1 至 2；及 **R¹** 至 **R⁴** 為相同或不同，且分別地表示氫、甲基或乙基。

【0011】 本發明之第三目的即在提供一種偵測一分析物中之過氧亞硝酸根離子的方法，包含：使該分析物與一如

下式(I)所示的丹磺醯衍生物或一如上所述的丹磺醯衍生物之錯合物反應，並量測所產生的螢光強度：

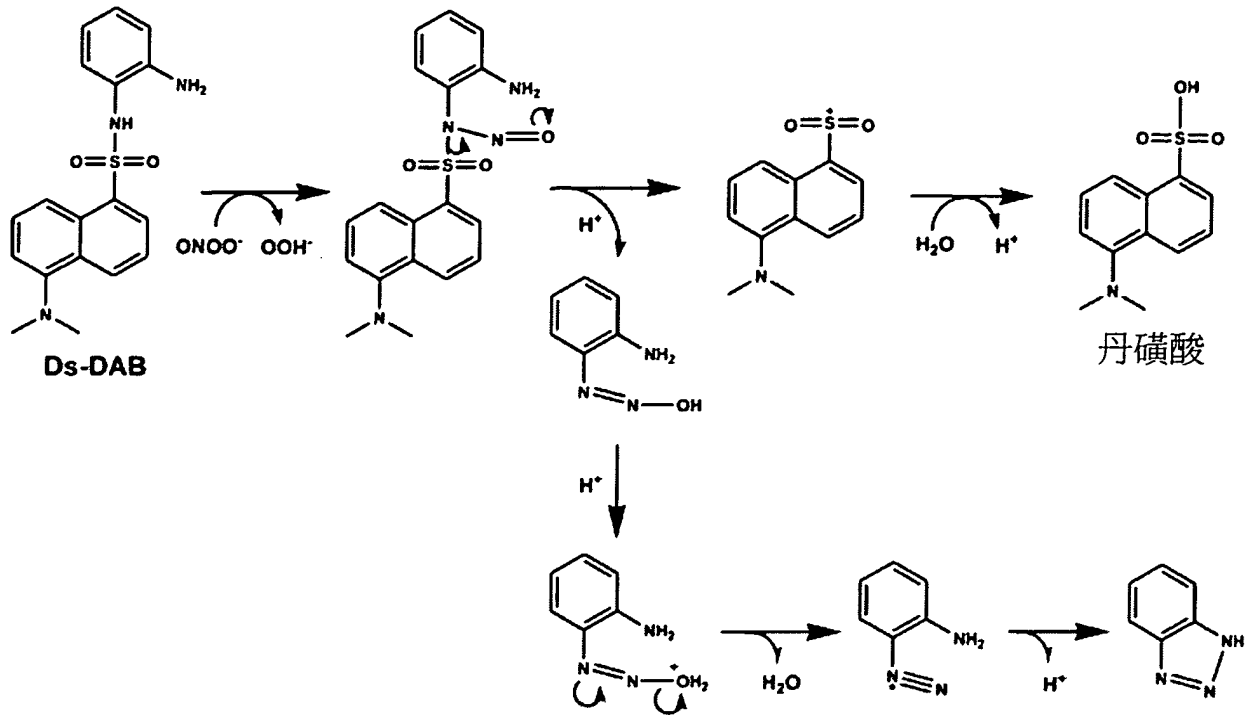


【0012】 其中， R^1 至 R^4 為相同或不同，且分別地表示氫、甲基或乙基。

【0013】 本發明之功效在於利用丹磺醯衍生物或其錯合物可快速並專一性地偵測過氧亞硝酸根離子，且其不具有細胞毒性，並能有效偵測細胞中的過氧亞硝酸根離子。

【0014】 以下將就本發明內容進行詳細說明：

【0015】 本發明丹磺醯衍生物 { 以 *N*-(2-胺基苯基)-5-(二甲基胺基)-1-萘磺醯胺 [*N*-(2-aminophenyl)-5-(dimethylamino)-1-naphtalenesulfonamide, Ds-DAB] 為例 } 與過氧亞硝酸根離子反應產生螢光，推測是透過以下的反應機制反應產生丹磺酸(dansyl acid)：



【0016】較佳地，在式(II)中， MX_n 是選自於 CuCl_2 、 FeSO_4 、 CoCl_2 、 CuSO_4 或 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 。在本發明的具體實施例中， MX_n 是 CuCl_2 。

【0017】較佳地，在式(II)中， R^1 至 R^4 皆表示氫。

【0018】較佳地，在上述製法中，該鹼是選自於三乙胺 (triethylamine)、吡啶 (pyridine)、*N,N*-二異丙基乙胺 (*N,N*-diisopropylethylamine) 或碳酸鉀。在本發明的具體實施例中，該鹼是三乙胺。

【0019】較佳地，在上述偵測方法中， R^1 至 R^4 皆表示氫。

【0020】較佳地，在上述偵測方法中，該螢光的最大放射波長範圍為 400 至 700 nm。更佳地，該螢光的最大放射波長範圍為 500 至 520 nm。在本發明的具體實施例中，該螢光的最大放射波長為 505 nm。

【0021】 較佳地，上述偵測方法是在一範圍落在 5.8 至 11.9 內的 pH 值下進行。在本發明的具體實施例中，上述偵測方法是在 pH 7.4 下進行。

【圖式簡單說明】

【0022】 本發明之其他的特徵及功效，將於參照圖式的實施方式中清楚地呈現，其中：

圖 1 顯示 Ds-DAB 與不同反應性含氧物種及反應性含氮物種反應後的螢光強度分析結果；

圖 2 顯示 Ds-DAB 與不同濃度之過氧亞硝酸根離子反應後的螢光強度分析結果；

圖 3 顯示 RAW 264.7 細胞在以不同濃度的 Ds-DAB 予以處理後所測得的細胞可活性百分比；

圖 4 顯示各組的 RAW 264.7 細胞在被處理以 Ds-DAB 之後藉由共軛焦螢光顯微鏡所觀察到的結果；

圖 5 顯示 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 與不同反應性含氧物種及反應性含氮物種的螢光強度分析結果；

圖 6 顯示 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 與不同濃度之過氧亞硝酸根離子反應後的螢光強度分析結果；

圖 7 顯示 RAW 264.7 細胞在以不同濃度的 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 金屬錯合物予以處理後所測得的細胞可活性百分比；以及

圖 8 顯示各組的 RAW 264.7 細胞在被處理以 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 金屬錯合物之後藉由共軛焦螢光顯微鏡所觀察到的結果。

【實施方式】

【0023】本發明將就以下實施例來作進一步說明，但應瞭解的是，該實施例僅為例示說明之用，而不應被解釋為本發明實施之限制。

<製備例> 丹磺醯衍生物 [Ds-DAB]

【0024】將 1.08 g (10 mmol) 鄰苯二胺 (*o*-phenylenediamine, 購自於 Sigma-Aldrich) 及 2.967 g (11 mmol) 丹磺醯氯 (dansyl chloride, 購自於 Sigma-Aldrich) 於圓底瓶中混合，以三氯甲烷作為反應溶劑，再緩慢滴入 1.6 mL 三乙胺，接著於 80°C 下回流 12 小時。待反應完畢後冷卻，並以真空系統抽乾，得到橘紅色固體。將該橘紅色固體利用矽膠管柱層析法進行純化分離，以甲醇：二氯甲烷 = 1：20 (體積比) 之比例作為溶析液，收集析出液並以減壓濃縮抽乾後，可得到 3.1 g 淡黃色固體 (9 mmol, 產率為 90%) 之 *N*-(2-胺基苯基)-5-(二甲基胺基)-1-萘磺醯胺 [*N*-(2-aminophenyl)-5-(dimethylamino)-1-naphtalenesulfonamide, Ds-DAB]。

【0025】其結構鑑定結果如下：ESI-MS (*m/z*)：計算值為 341.1，發現值為 342.2 ($[M+H]^+$)；¹H NMR (CDCl₃, ppm)：δ 8.55 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.41 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.10 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.59 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.43 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.24 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.02 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.68 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.59 (s, 1H), 6.43 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.32 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 4.04 (s, 2H), 2.95 (s, 6H)；IR (KBr,

cm^{-1}) : $\nu(\text{NH}_2)+\nu(\text{NH})$ 3434, 3350, $\nu(\text{SO}_2)_{\text{as}}$ 1321, $\nu(\text{SO}_2)_{\text{s}}$ 1162。

< 實施例 > 丹磺醯衍生物之錯合物 $[\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2]$

【0026】 以二甲亞砜(DMSO)配製 2.5 mM 製備例製得之 Ds-DAB 作為原液，取 20 μL 原液並以 10 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)稀釋至 2 mL，再加入 1.83 μL 30 mM 氯化銅(II)(CuCl_2)水溶液，進行錯合反應 10 分鐘後，得到丹磺醯衍生物之錯合物 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 。

【0027】 經由 HPLC 分析[梯度由 50% 甲醇水溶液至 100% 甲醇(含 0.1% 甲酸)，流速為 1 mL/min，UV 波長設定為 300 nm，螢光放射波長為 555 nm]，在 13.7 min 處有一吸收峰 $[\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2]$ 。其鑑定結果如下：ESI-MS (m/z): 475.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)， M^+ 為 474.0；IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{NH}_2)+\nu(\text{NH})$ 3436, 3364, $\nu(\text{SO}_2)_{\text{as}}$ 1336, $\nu(\text{SO}_2)_{\text{s}}$ 1114； $\Phi=0.148$ (在水中)。

一般實驗材料：

1. 反應性含氧物種及反應性含氮物種

【0028】 本發明所使用的 9 種反應性含氧物種(reactive oxygen species, ROS)、反應性含氮物種(reactive nitrogen species, RNS)及其來源如下表所示：

| ROS 或 RNS | 來源 |
|------------------|---|
| $\cdot\text{OH}$ | $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 與 H_2O_2 反應 |
| OCl^- | NaOCl 水溶液 |

| | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| HNO | Angeli's salt 之 10 mM NaOH 水溶液 |
| •NO | NO 水溶液 |
| NO ₂ ⁻ | NaNO ₂ 水溶液 |
| NO ₃ ⁻ | NaNO ₃ 水溶液 |
| H ₂ O ₂ | 30% H ₂ O ₂ 水溶液 |
| •O ₂ ⁻ | KO ₂ 固體 |
| ONOO ⁻ | ONOO ₂ Na 之 0.3 M NaOH 水溶液 |

2. 細胞株的來源與培養

【0029】 在下面實施例中所使用的老鼠巨噬細胞株 (mouse macrophage cell line) RAW 264.7 是購自於美國類型培養物收集中心 (American Type Culture Collection, ATCC)，寄存編號 (accession number) 為 TIB-71。

【0030】 RAW 264.7 細胞被培養於含有杜貝可氏改良的依格氏培養基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)(購自於 Cellgro)[添加有 10%胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)(購自於 HyClone)、1% 丙酮酸鈉 (sodium pyruvate)以及 1% MEM]的培養皿 (petri dish)中，接著在培養條件被設定為 37°C 與 5% CO₂ 的培養箱中進行培養。之後，大約每隔 1-2 天更換新鮮的培養基。當細胞密度達到約 80-90%匯聚 (confluence)時，移除培養基並以磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate Buffered Saline, PBS)(pH 7.4)來清洗細胞共計 3 次，接著加入胰蛋白酶-EDTA (trypsin-EDTA) 以使細胞自培養皿的底部脫離。之後，加入新鮮的培養基來中和胰蛋白酶的活性並以量吸管 (pipette)反覆地吸沖培

養基以充分打散細胞，然後將所形成的細胞懸浮液分配到新的培養皿中，並在培養條件被設定為 37°C 與 5% CO₂ 的培養箱中進行培養。

< 應用例 1 >

[Ds-DAB 的專一性測試]

【0031】 以 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4，含 1% DMSO) 配製 9 份 10 μM Ds-DAB 溶液，分別與上述“一般實驗材料”第 1 項的 9 種 ROS 及 RNS(20 當量)反應 2 小時後，分別以螢光光譜儀(激發波長為 350 nm)測量 505 nm 的螢光強度 F ，並計算與空白實驗所得之螢光強度 F_0 的比值 (F/F_0)，結果如圖 1 所示。

【0032】 由圖 1 可以發現，本發明製備例製得之 Ds-DAB 與過氧亞硝酸根離子 (ONOO^-) 反應後產生明顯較高的 F/F_0 值(大於 6)，對於其餘 8 種 ROS 及 RNS 則產生明顯較低的 F/F_0 值(小於 1.5)，顯示 Ds-DAB 能選擇性地透過螢光強度偵測過氧亞硝酸根離子，並具有高度的專一性。

[Ds-DAB 對於過氧亞硝酸根離子的偵測]

【0033】 以 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4，含 1% DMSO) 配製 7 份 10 μM Ds-DAB 溶液，分別加入 0.0、1.0、2.0、2.5、3.5、4.0 及 4.5 當量之過氧亞硝酸根離子反應 5 分鐘後，分別以螢光光譜儀(激發波長為 350 nm)測量 505 nm 的螢光強度，並以螢光強度對於過氧亞硝酸根離子的濃度作圖，結果如圖 2 所示。

【0034】 由圖 2 可以得知，Ds-DAB 與過氧亞硝酸根離子

反應所產生的螢光強度隨著過氧亞硝酸根離子的濃度增加而增加，且呈現高度的線性關係($R^2=0.994$)，顯示 Ds-DAB 能透過螢光強度定量得到過氧亞硝酸根離子的濃度。此外，根據此線性關係可計算出 Ds-DAB 對於過氧亞硝酸根離子的偵測極限為 52.6 nM。

[Ds-DAB 的細胞可活性分析 (cell viability analysis)]

【0035】為瞭解本發明的 Ds-DAB 的細胞毒性 (cytotoxicity)，依據上面製備例所得到的 Ds-DAB 被拿來進行下面的實驗。

【0036】首先，將依據上面“一般實驗材料”的第 2 項「細胞株的來源與培養」來進行繼代培養的 RAW 264.7 細胞分成 4 組，其中包括 1 個對照組 (control) 以及 3 個實驗組 (亦即實驗組 1 至 3)。將各組細胞分別以一為 10^5 細胞/井的數量培養於含有 100 μ L 的 DMEM (添加有 10% 胎牛血清、1% 丙酮酸鈉以及 1% MEM) 的 96-井培養盤 (96-well plate) 中，並在培養箱 (37°C 、5% CO_2) 中進行培養歷時 24 小時。

【0037】接著，將各組的細胞培養物分別更換以新鮮的培養基，繼而將適量之依據上面製備例所得到的 Ds-DAB 分別添加至實驗組 1 至 3 中，而使得實驗組 1 至 3 分別具有一最終濃度為 6.25、12.5 以及 25 μ M 的 Ds-DAB。至於對照組的細胞培養物則不作任何處理。各組細胞培養物在培養箱 (37°C ，5% CO_2) 中進行培養歷時 24 小時後，移除各井中的液體，繼而加入 20 μ L 的含有 5 mg/mL 3-[4,5-二甲基噻唑 -2-基]-2,5-二苯四唑溴化物

{3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT}的新鮮培養基並予以培養歷時 4 小時。之後，移除各井中的液體，繼而加入 100 μ L 的 DMSO 並予以混合均勻，然後於 490 nm 的波長下以一 ELISA 讀取機 (ELISA reader, SpectraMax Plus384, Molecular Devices) 來讀取各井的吸光值 (OD₄₉₀)。

【0038】 細胞可活性百分比 (%) 是藉由將所測得的吸光值 (OD₄₉₀) 代入下列公式 (1) 而被計算出：

$$\text{公式 (1): } A = (B/C) \times 100$$

其中：A = 細胞可活性百分比 (%)

B = 各組所測得的 OD₄₉₀ 吸光值

C = 對照組所測得的 OD₄₉₀ 吸光值

【0039】 圖 3 顯示 RAW 264.7 細胞在以不同濃度的 Ds-DAB 予以處理後所測得的細胞可活性百分比。從圖 3 可見，與對照組相較之下，實驗組 1 至 3 的細胞可活性百分比沒有呈現顯著的差異性。這個實驗結果顯示：Ds-DAB 不會對細胞造成傷害，因此不具有細胞毒性。

[Ds-DAB 在偵測細胞中過氧亞硝酸根離子上的效用評估]

【0040】 爲了探討 Ds-DAB 在偵測細胞中過氧亞硝酸根離子上的效用，在上面製備例所得到的 Ds-DAB 被拿來處理細胞並藉由共軛焦螢光顯微鏡 (confocal fluorescence microscope) 來觀察細胞影像 (cell image)。

【0041】 首先，將依據上面“一般實驗材料”的第 2 項「細胞株的來源與培養」來進行繼代培養的 RAW 264.7 細胞分

成 4 組，其中包括 1 個實驗組以及 3 個對照組 (control)(亦即，對照組 1、2 以及 3)。將各組細胞分別以一為 1×10^5 細胞的數量培養於含有 100 μL 的 DMEM (添加有 10% FBS、1% 丙酮酸鈉以及 1% MEM) 的培養皿中，並在培養箱 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2) 中進行培養歷時 24 小時。

【0042】 接著，將各組的細胞培養物分別更換以新鮮的培養基 (添加有 10% FBS、1% 丙酮酸鈉、1% MEM、1% DMSO 以及適量之依據上面製備例所得到的 Ds-DAB)，而使得各組的細胞培養物皆具有一最終濃度為 10 μM 的 Ds-DAB。另外，將適量之脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)(購自於 Sigma-Aldrich) 添加至實驗組的細胞培養物中，而使其具有一最終濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS，在靜置歷時 4 小時之後，添加適量之巴豆醇-12-十四烷酸酯-13-乙酸酯 (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)(購自於 Sigma-Aldrich) 而使其具有一最終濃度為 10 nM 的 PMA，然後靜置歷時 30 分鐘。將適量之 LPS 以及 2,2,6,6-四甲基-哌啶-N-氧化物 (2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-N-oxyl, TEMPO)(購自於 Sigma-Aldrich) 添加至對照組 2 的細胞培養物中，而使其具有一最終濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 以及一最終濃度為 100 μM 的 TEMPO，在靜置歷時 4 小時之後，添加適量之 PMA 而使其具有一最終濃度為 10 nM 的 PMA，然後靜置歷時 30 分鐘。將適量之 LPS 以及胺胍 (aminoguanidine)(購自於 Sigma-Aldrich) 添加至對照組 3 的細胞培養物中，而使其具有一最終濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS

以及一最終濃度為 1 mM 的胺胍，在靜置歷時 4 小時之後，添加適量之 PMA 而使其具有一最終濃度為 10 nM 的 PMA，然後靜置歷時 30 分鐘。之後，使用一共軛焦螢光顯微鏡 (型號為 TCS-SP5-XAOBS，購自於 Leica) 並在一為 100 倍的放大倍數下來觀察各組的細胞並照相記錄。

【0043】圖 4 顯示各組的 RAW 264.7 細胞在被處理以 Ds-DAB 之後藉由共軛焦螢光顯微鏡所觀察到的結果。從圖 4 可見，在實驗組的細胞培養物中有添加 LPS 以及 PMA 因而會誘發細胞生成一氧化氮以及超氧離子，它們會互相結合以生成過氧亞硝酸根離子，進而被 Ds-DAB 偵測到並且展現出明顯的螢光。相反地，對照組 1 的細胞培養物沒有添加 LPS 以及 PMA，而對照組 2 以及對照組 3 的細胞培養物分別有添加會抑制超氧離子生成的 TEMPO 以及會抑制一氧化氮生成的胺胍，這 3 組細胞皆不會生成過氧亞硝酸根離子，因而不會被 Ds-DAB 偵測到。這個實驗結果顯示：依據本發明的 Ds-DAB 能夠專一性地偵測到細胞中的過氧亞硝酸根離子。

< 應用例 2 >

[Cu(Ds-DAB)Cl₂ 的專一性測試]

【0044】以 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4，含 1% DMSO) 配製 9 份 25 μM Cu(Ds-DAB)Cl₂ 溶液，分別與上述 9 種 ROS 及 RNS (20 當量) 反應 2 小時後，分別以螢光光譜儀 (激發波長為 380 nm) 測量 505 nm 的螢光強度 F，並計算與空白實驗所得之螢光強度 F₀ 的比值 (F/F₀)，結果如圖 5 所示。

【0045】 由圖 5 可以發現，本發明實施例製得之 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 與過氧亞硝酸根離子 (ONOO^-) 反應後產生明顯較高的 F/F_0 值 (大於 5)，對於其餘 8 種 ROS 及 RNS 則產生明顯較低的 F/F_0 值 (小於 2)，顯示 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 能選擇性地透過螢光強度偵測過氧亞硝酸根離子，並具有高度的專一性。

[$\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 對於過氧亞硝酸根離子的偵測]

【0046】 以 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4，含 1% DMSO) 配製 5 份 25 μM $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 溶液，分別加入 0、10、25、50 及 60 當量之過氧亞硝酸根離子反應 10 分鐘後，分別以螢光光譜儀 (激發波長為 380 nm) 測量 505 nm 的螢光強度，並以螢光強度對於過氧亞硝酸根離子的濃度作圖，結果如圖 6 所示。

【0047】 由圖 6 可以得知， $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 與過氧亞硝酸根離子反應所產生的螢光強度隨著過氧亞硝酸根離子的濃度增加而增加，且呈現高度的線性關係 ($R^2=0.998$)，顯示 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 能透過螢光強度定量得到過氧亞硝酸根離子的濃度。此外，根據此線性關係可計算出 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 對於過氧亞硝酸根離子的偵測極限為 0.87 μM 。

[$\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 的細胞可活性分析]

【0048】 為瞭解本發明的 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 的細胞毒性，依據上面實施例所得到的 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 被拿來進行下面的實驗。

【0049】 首先，將依據上面“一般實驗材料”的第 2 項「細胞株的來源與培養」來進行繼代培養的 RAW 264.7 細胞分成 4 組，其中包括 1 個對照組以及 3 個實驗組(亦即實驗組 1 至 3)。將各組細胞分別以一為 10^5 細胞/井的數量培養於含有 100 μL 的 DMEM (添加有 10%胎牛血清、1%丙酮酸鈉以及 1% MEM)的 96-井培養盤(96-well plate)中，並在培養箱(37°C、5% CO_2)中進行培養歷時 24 小時。

【0050】 接著，將各組的細胞培養物分別更換以新鮮的培養基，繼而將適量之依據上面實施例所得到的 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 分別添加至實驗組 1 至 3 中，而使得實驗組 1 至 3 分別具有一最終濃度為 12.5、25 以及 50 μM 的 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 。至於對照組的細胞培養物則不作任何處理。各組細胞培養物在培養箱(37°C，5% CO_2)中進行培養歷時 24 小時後，移除各井中的液體，繼而加入 20 μL 的含有 5 mg/mL MTT 的新鮮培養基並予以培養歷時 4 小時。之後，移除各井中的液體，繼而加入 100 μL 的 DMSO 並予以混合均勻，然後於 490 nm 的波長下以一 ELISA 讀取機來讀取各井的吸光值(OD_{490})。

【0051】 細胞可活性百分比(%)是藉由將所測得的吸光值(OD_{490})代入如上面應用例 1 所示的公式(1)中而被計算出。

【0052】 圖 7 顯示 RAW 264.7 細胞在以不同濃度的 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 予以處理後所測得的細胞可活性百分比。從圖 7 可見，與對照組相較之下，實驗組 1 至 3 的細胞可

活性百分比沒有呈現顯著的差異性。這個實驗結果顯示： Cu(Ds-DAB)Cl_2 不會對細胞造成傷害，因此不具有細胞毒性。

[Cu(Ds-DAB)Cl_2 在偵測細胞中過氧亞硝酸根離子上的效用評估]

【0053】 爲了探討 Cu(Ds-DAB)Cl_2 在偵測細胞中過氧亞硝酸根離子上的效用，在上面實施例所得到的 Cu(Ds-DAB)Cl_2 被拿來處理細胞並藉由共軛焦螢光顯微鏡來觀察細胞影像。

【0054】 首先，將依據上面“一般實驗材料”的第 2 項「細胞株的來源與培養」來進行繼代培養的 RAW 264.7 細胞分成 4 組，其中包括 1 個實驗組以及 3 個對照組(亦即，對照組 1、2 以及 3)。將各組細胞分別以一爲 1×10^5 細胞的數量培養於含有 100 μL 的 DMEM (添加有 10% FBS、1% 丙酮酸鈉以及 1% MEM) 的培養皿中，並在培養箱 (37°C 、5% CO_2) 中進行培養歷時 24 小時。

【0055】 接著，將各組的細胞培養物分別更換以新鮮的培養基 [添加有 10% FBS、1% 丙酮酸鈉、1% MEM、1% DMSO 以及適量之依據上面實施例所得到的 Cu(Ds-DAB)Cl_2]，而使得各組的細胞培養物皆具有一最終濃度爲 10 μM 的 Cu(Ds-DAB)Cl_2 。另外，將適量之 LPS 添加至實驗組的細胞培養物中，而使其具有一最終濃度爲 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS，在靜置歷時 4 小時之後，添加適量之 PMA 而使其具有一最終濃度爲 10 nM 的 PMA，然後靜置歷時 30

分鐘。將適量之 LPS 以及 TEMPO 添加至對照組 2 的細胞培養物中，而使其具有一最終濃度為 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 以及一最終濃度為 $100 \mu\text{M}$ 的 TEMPO，在靜置歷時 4 小時之後，添加適量之 PMA 而使其具有一最終濃度為 10 nM 的 PMA，然後靜置歷時 30 分鐘。將適量之 LPS 以及胺胍添加至對照組 3 的細胞培養物中，而使其具有一最終濃度為 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 以及一最終濃度為 1 mM 的胺胍，在靜置歷時 4 小時之後，添加適量之 PMA 而使其具有一最終濃度為 10 nM 的 PMA，然後靜置歷時 30 分鐘。之後，使用一共軛焦螢光顯微鏡並在一為 100 倍的放大倍數下來觀察各組的細胞並照相記錄。

【0056】圖 8 顯示各組的 RAW 264.7 細胞在被處理以 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 之後藉由共軛焦螢光顯微鏡所觀察到的結果。從圖 8 可見，在實驗組的細胞培養物中有添加 LPS 以及 PMA 因而會誘發細胞生成一氧化氮以及超氧離子，它們會互相結合以生成過氧亞硝酸根離子，進而被 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 偵測到並且展現出明顯的螢光。相反地，對照組 1 的細胞培養物沒有添加 LPS 以及 PMA，而對照組 2 以及對照組 3 的細胞培養物分別有添加會抑制超氧離子生成的 TEMPO 以及會抑制一氧化氮生成的胺胍，這 3 組細胞皆不會生成過氧亞硝酸根離子，因而不會被 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 偵測到。這個實驗結果顯示：依據本發明的 $\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2$ 能夠專一性地偵測到細胞中的過氧亞硝酸根離子。

【0057】 綜上所述，本發明製備例製得之丹磺醯衍生物(Ds-DAB)及實施例製得之丹磺醯衍生物之錯合物 $[\text{Cu}(\text{Ds-DAB})\text{Cl}_2]$ 可藉由量測螢光強度快速並專一性地偵測過氧亞硝酸根離子，且其不具有細胞毒性，並能有效偵測細胞中的過氧亞硝酸根離子，故確實能達成本發明之目的。

【0058】 於本說明書中被引述之所有專利和文獻以其整體被併入本案作為參考資料。若有所衝突時，本案詳細說明(包含界定在內)將佔上風。

【0059】 惟以上所述者，僅為本發明之較佳實施例而已，當不能以此限定本發明實施之範圍，即大凡依本發明申請專利範圍及專利說明書內容所作之簡單的等效變化與修飾，皆仍屬本發明專利涵蓋之範圍內。

【符號說明】

【0060】 無。

【生物材料寄存】

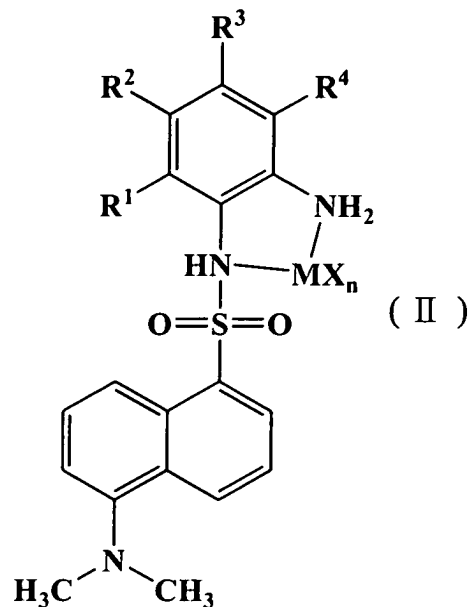
國內寄存資訊【請依：寄存機構、日期、號碼順序註記】

國外寄存資訊【請依：寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

【序列表】 (請換頁單獨記載)

申請專利範圍

1. 一種偵測一分析物中之過氧亞硝酸根離子的方法，包含：
：使該分析物與一如下式(II)所示的丹磺醯衍生物之錯合物反應，並量測所產生的螢光強度：



其中，

MX_n 是選自於 CuCl_2 、 CuSO_4 或 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ；及

R^1 至 R^4 為相同或不同，且分別地表示氫、甲基或乙基。

2. 如請求項 1 所述的方法，其中， R^1 至 R^4 皆表示氫。
3. 如請求項 1 所述的方法，其中，該螢光的最大放射波長範圍為 400 至 700 nm。
4. 如請求項 1 所述的方法，其是在一範圍落在 5.8 至 11.9 內的 pH 值下進行。

圖式

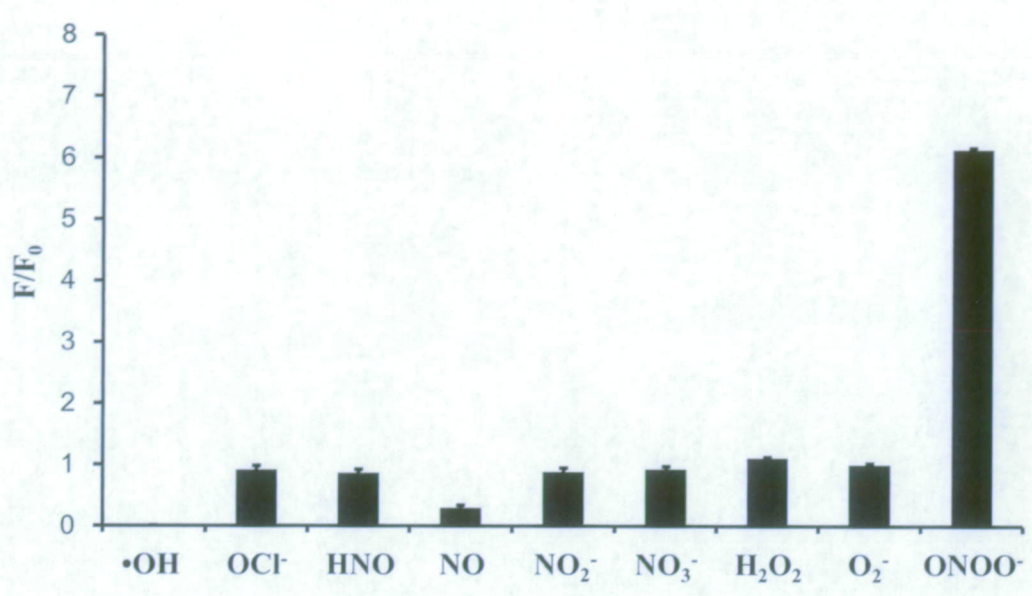


圖 1

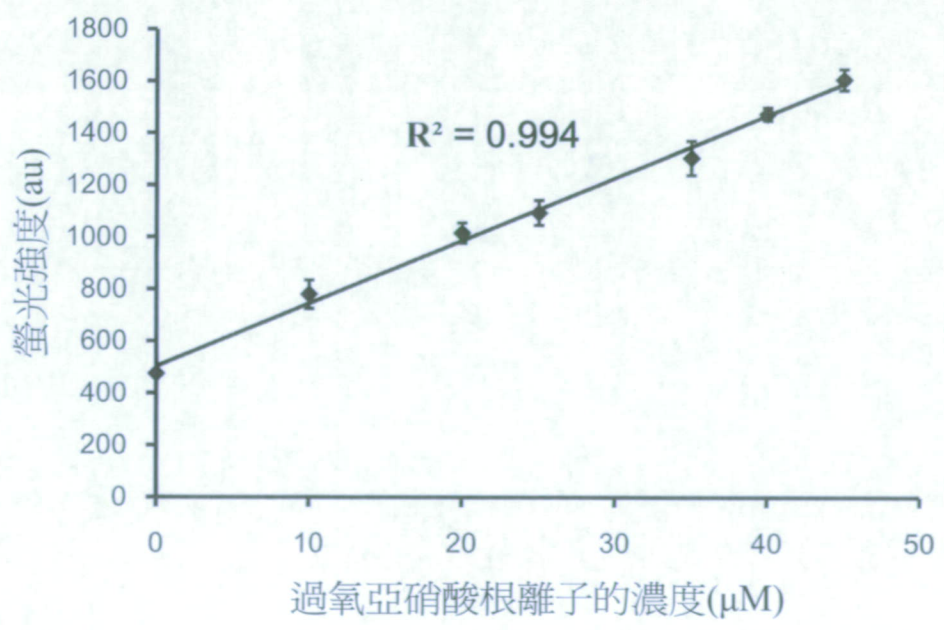


圖 2

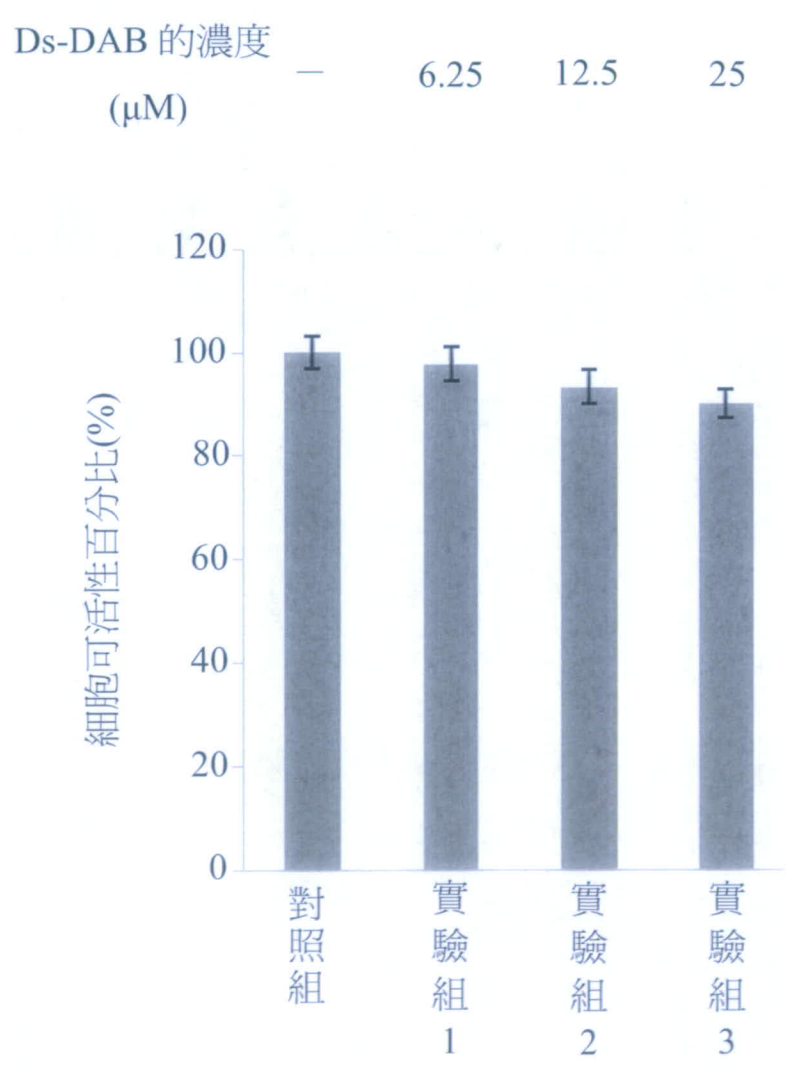
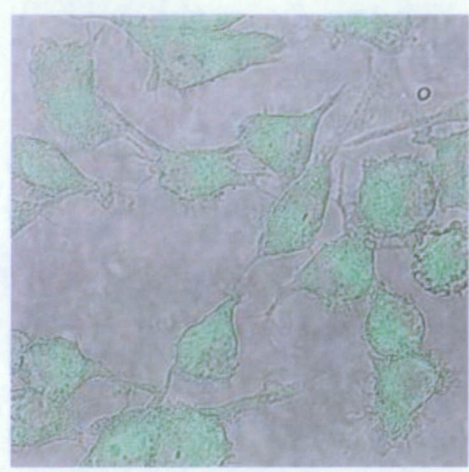


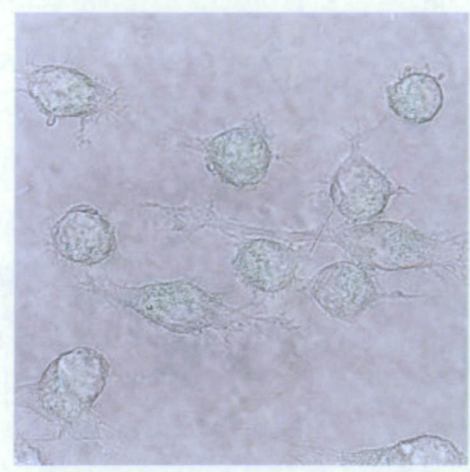
圖 3

LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) +
PMA (10 nM) +



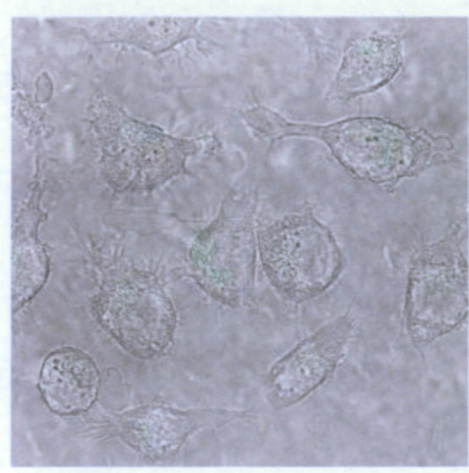
實驗組

-
-



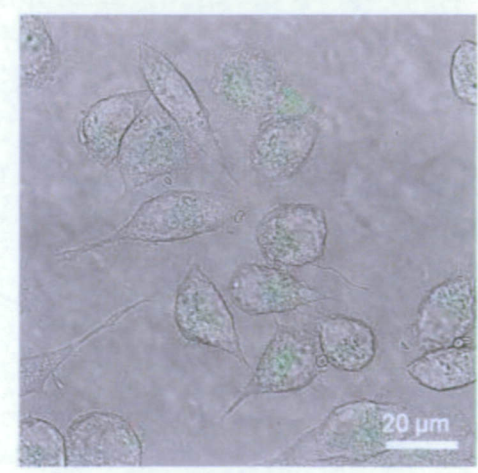
對照組 1

LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) +
PMA (10 nM) +
TEMPO (100 μM) +
胺胍(1 mM) -



對照組 2

+
+
-
+



對照組 3

圖 4

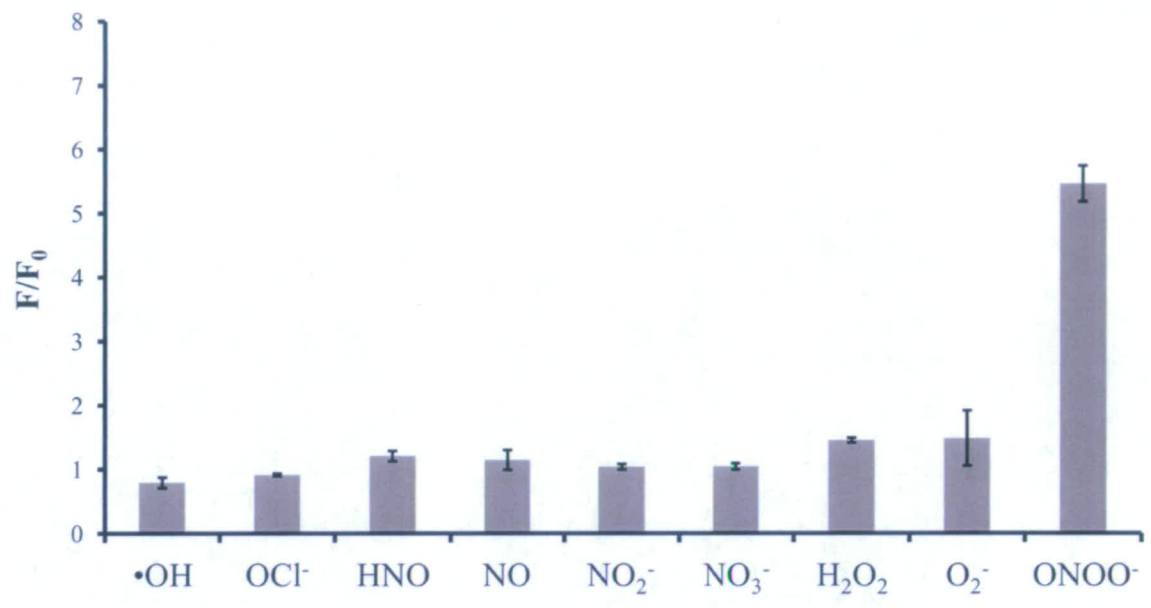


圖 5

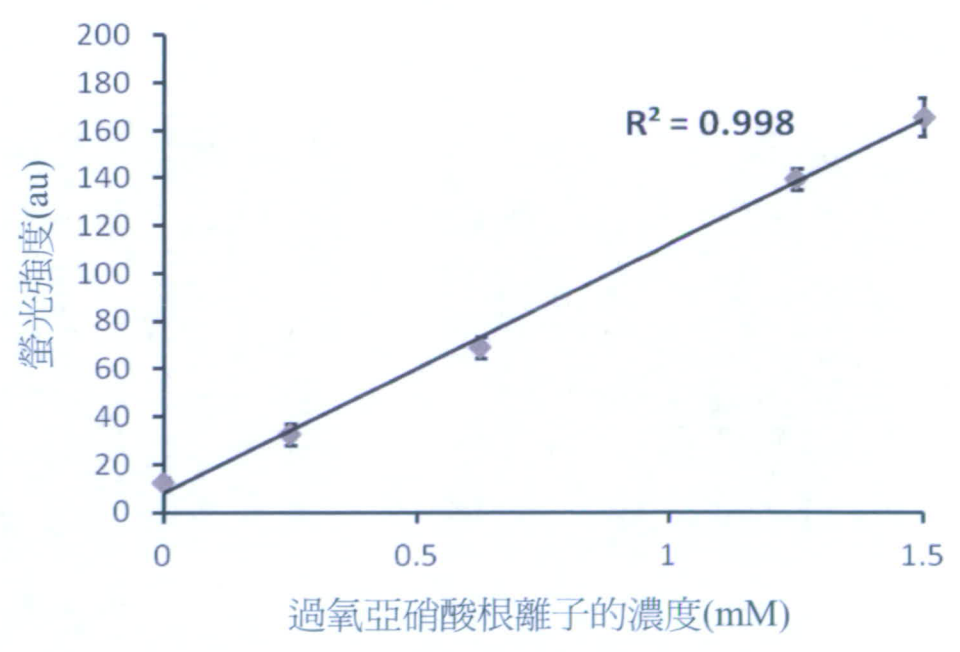


圖 6

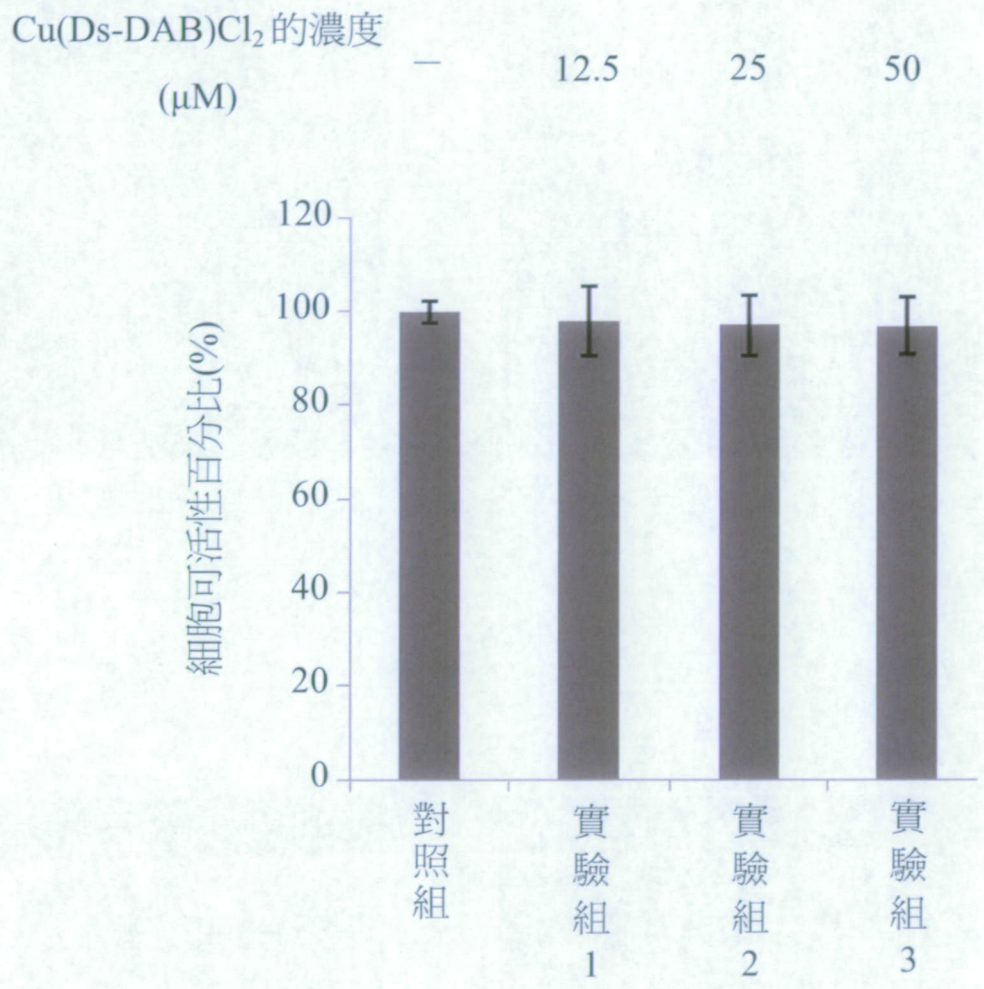
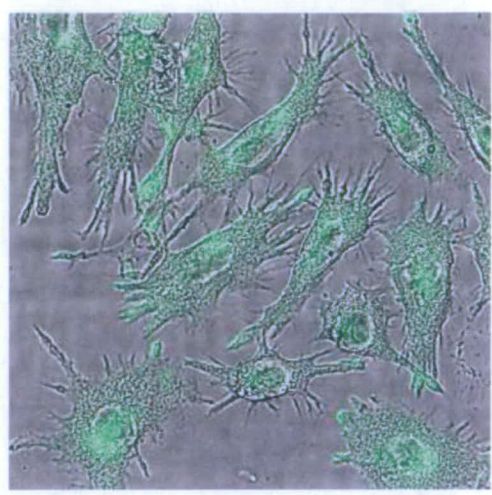
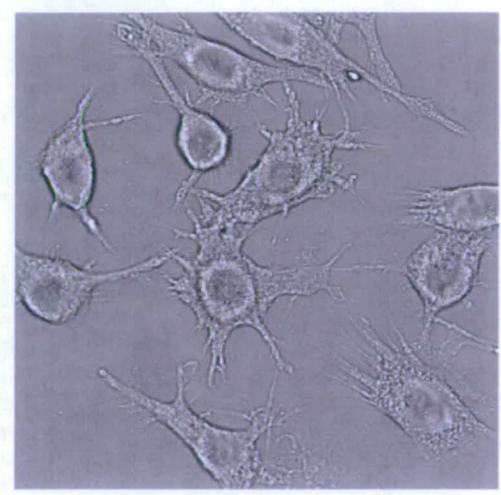


圖 7

LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) +
PMA (10 nM) +

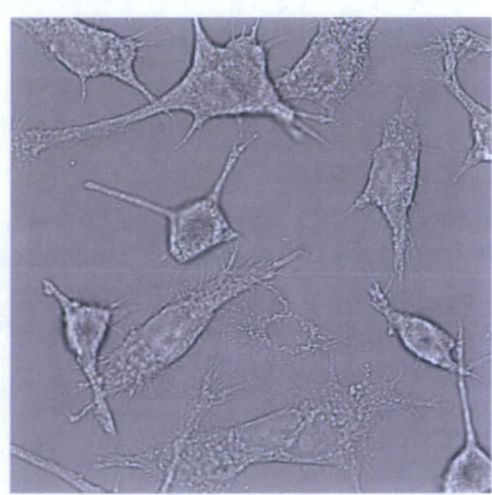


實驗組



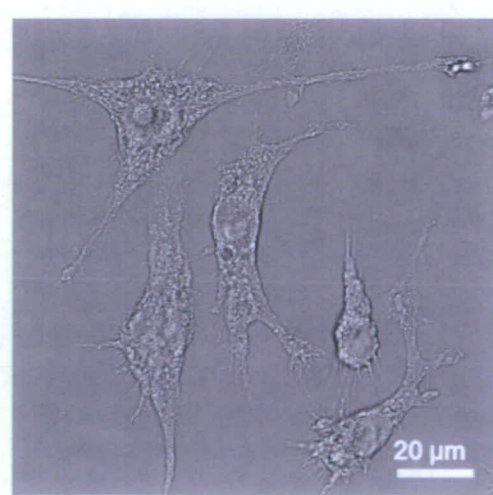
對照組 1

LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) +
PMA (10 nM) +
TEMPO (100 μM) +
胺胍(1 mM) -



對照組 2

+
+
-
+



對照組 3

圖 8