

第一章、緒論

1-1 前言

人類具有 23 對染色體，並有將近三十億鹼基對的去氧核糖核酸，在這個龐大的 DNA 序列中包含著將近三萬個基因，而每個基因又會轉錄成 mRNA，每個 mRNA 又會轉譯成蛋白質，在細胞中進行其個別工作。儲存如此重要的 DNA 及 RNA 遺傳物質，需要具有非常顯著的動力學穩定。據估計 DNA 的磷酸雙酯鍵在中性、25°C 環境下，其半生期高達十三萬年¹，由於 RNA 骨架上的五碳糖具有 2'-OH，使得 RNA 的磷酸雙酯鍵比 DNA 更加不穩定，因此估計 RNA 的半生期在相同環境下約為數年²。圖 1-1 為 DNA/RNA 之水解位置。

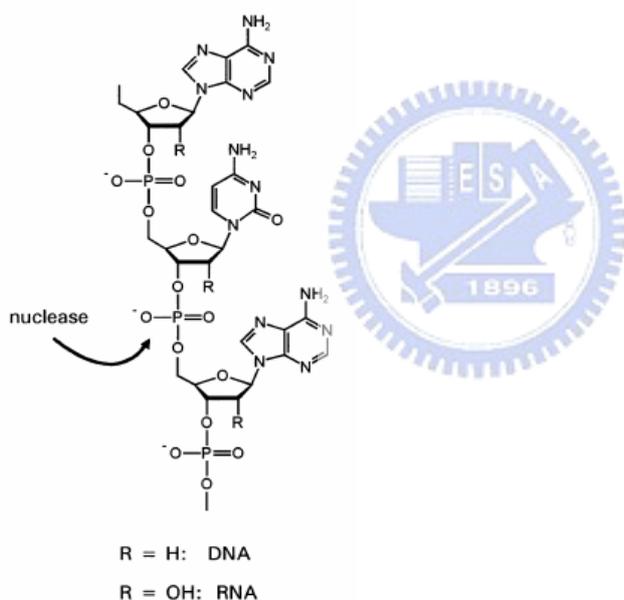


圖 1-1 箭頭指向為核酸酶水解 DNA/RNA 的位置。

雖然遺傳物質的磷酸雙酯鍵如此穩定，但是細胞在某些特定情況下仍是需要分解或修補 DNA 或 RNA 序列，例如修補受損的 DNA 序列、分解不需要的 mRNA 及外來入侵者的遺傳物質。生物體為了延續自己的生命就必須一直進行這些動作，而在生物體進行這些工作的酵素就統稱為核酸水解酶。通常這些天然界的核酸水解酶，其蛋白質核心都具有金屬離子作為輔因子，其中最常做為輔因子的金

屬離子包含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 等。

早期的研究是專注在 DNA 及 RNA 之水解機制，及天然核酸水解酶的金屬離子輔因子在酵素內的作用機制；我們已知 RNA 遠比 DNA 來的更加不穩定，主要是 RNA 骨架上的五碳糖上多了一個 2'-OH。目前比較被接受的 RNA 水解機制包含兩個步驟³，首先是轉酯步驟，五碳糖上 2'-OH 的氫離子會先解離形成強攻擊基 (alkoxide)，此攻擊基與 3' 端的磷酸酯鍵反應形成五配位的中間過渡態活化物，環磷酸酯 (2',3'-cyclic phosphate)；第二步驟是進行水解反應，環磷酸酯會隨機的被水解成 2'-phosphate 或 3'-phosphate，而完成整個水解反應。而 DNA 的水解則需要外來的強攻擊基進行反應，因此在鹼性環境下，DNA 跟 RNA 都會顯得更加不穩定，圖 1-2 是 DNA 及 RNA 在鹼性環境下的水解機制³。

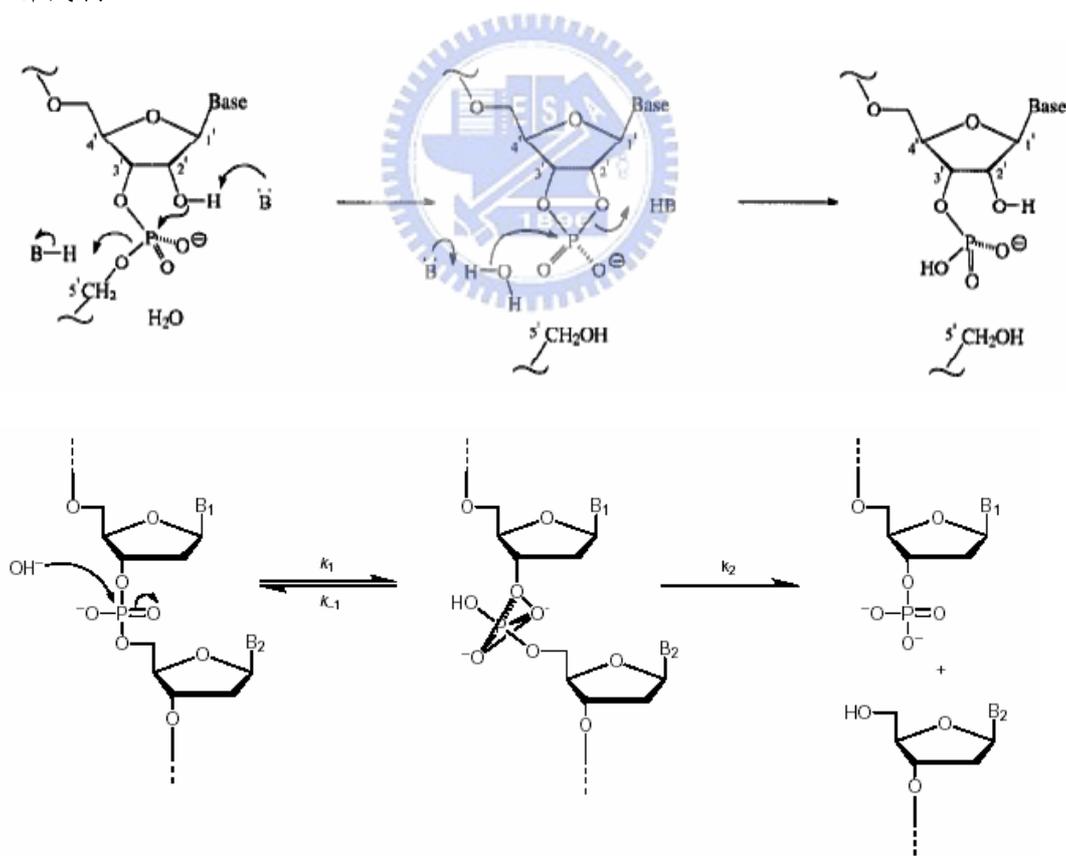


圖 1-2、DNA 及 RNA 在鹼性環境下的水解機制。

後來科學家發現若整個水解反應有金屬離子參與，可促使水解反應更容易進

行，於是科學家開始研究金屬離子在酵素內扮演的角色及其反應機制。據研究指出，金屬離子在水解過程中可能具有以下四種功用，第一，金屬離子和水配位，並促進配位水解離形成金屬氫氧根離子 (metal-bound hydroxyl anion)，以扮演路易士鹼的角色來抓取 2'-OH 上的氫離子，使之成為強攻擊基進行之後的水解反應；第二，金屬離子吸引 2'-OH 上氧原子的電子雲，促使 2'-OH 更容易解離形成強攻擊基；第三，金屬離子藉由靜電吸引力，以穩定轉酯過程中所產生的中間過渡態；第四，金屬離子可以穩定離去基 (leaving group)，使水解反應更容易進行⁴。

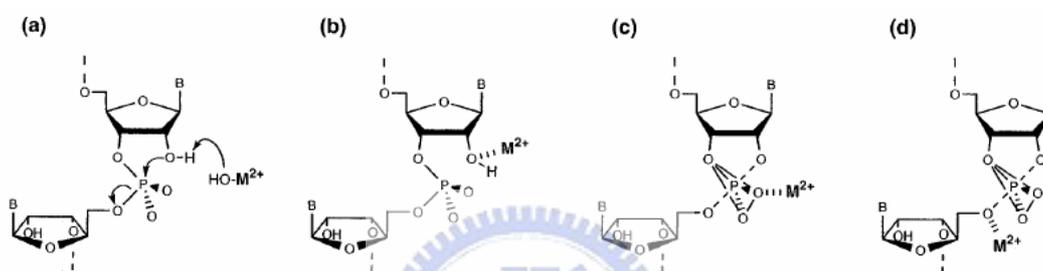


圖 1-3、金屬離子在水解過程所扮演的角色。

近年來仿造天然核酸水解酶的人造水解酶引起大家廣泛的興趣，因其除了在基礎科學上可幫助我們更加瞭解金屬離子在天然水解酶中的角色及作用機制外，也可設計為具有特殊構型的探針 (probe)，以專門辨識某些特殊物質而應用在生物醫學上⁵。此外，人造水解酶更可以應用在分子生物學上⁶，因一般天然界的限制酶，只能辨識 4、6 或 8 個鹼基序列，由於天然限制酶的鑑識度太低，使得在應用上會產生許多 DNA 小片段而難以處理分離，因此若在人造水解酶上接上一段超過 15 個鹼基的序列，即可增加人造水解酶的鑑識度，並方便我們在分子生物學上的應用⁷。

因為金屬離子在高 pH 值環境下，會產生多核金屬離子氫氧化合物沉澱，故本實驗室專注研究在設計大環配位子，配位子可與金屬離子錯合後穩定金屬離子，進而可在高 pH 值環境下可水解磷酸雙酯鍵。

1-2 文獻回顧

早期科學家藉由天然水解酶為模型以模擬發展人造核酸水解酶，其中較著名的是 alkaline 及 purple acid phosphatases，這兩種核酸水解酶都是利用雙金屬離子與酵素核心的胺基酸協同作用，來活化水解磷酸雙酯鍵⁸。以 alkaline phosphatases 為例，它是經由兩步驟催化水解 DNA，當雙金屬離子固定住 DNA 序列，一個 Zn^{2+} 就會活化 $Ser_{102}-OH$ ，使之攻擊磷原子而形成五配位的中間過渡態，然後經由另一個 Zn^{2+} 活化的配位水就會進行最後的水解步驟。

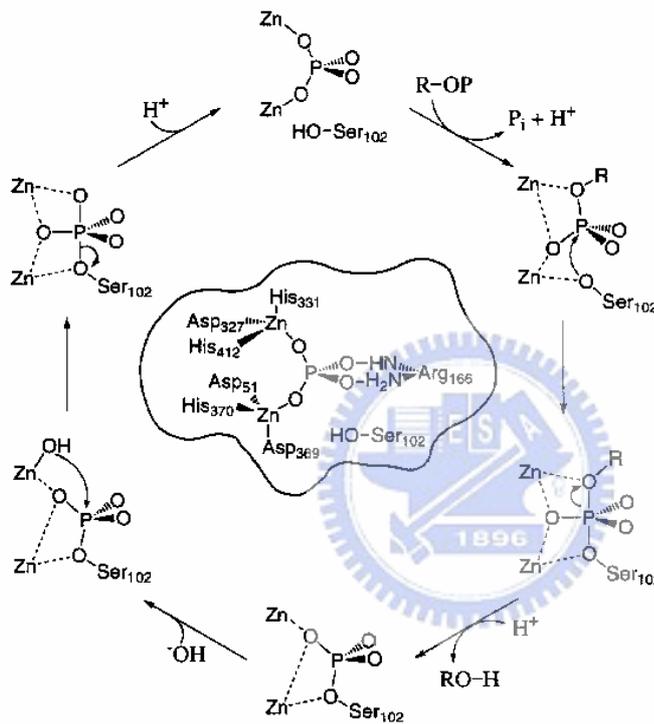


圖 1-4、Alkaline phosphatases 水解 DNA 的機制。

1986-1990 年，Breslow 等人仿照 alkaline phosphate，製造出 Zn^{2+} 錯合的含氮大環，經由水解磷酸酯鍵 (DPPNPP) 的實驗指出，在 $pH=8.7$ 的環境下，人造水解酶的反應速率會大大提升，他們推斷在這個 pH 值環境下，有一個活性物種 (Zinc hydroxide complex) 產生。除此之外，藉由比較三種大環錯合物對 DPPNPP 的反應速率可得知，接有官能基的金屬錯合物 1 及 2，其水解速率比錯合物 3 分別提升了九及二十倍，顯示這些輔助官能基具有一般鹼基的功能，可促進催化反應⁹。

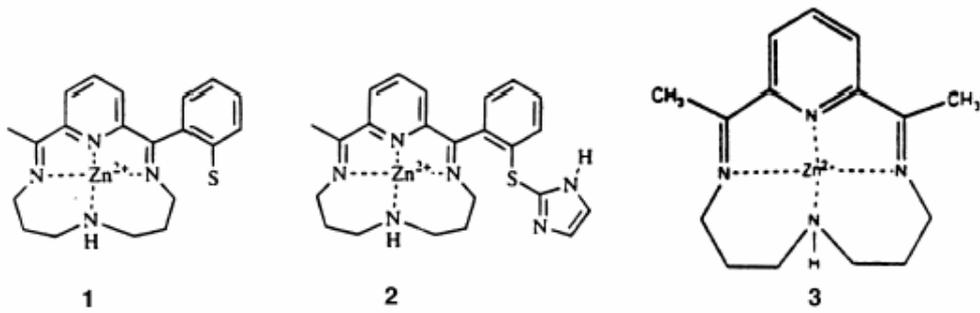


圖 1-5、三種含氮大環之結構。

1989-1990 年，Hendry 與 Sargeson 發表以含有 Co^{3+} 及 Ir^{3+} 的大環錯合物，研究其催化水解磷酸雙酯鍵的反應機制，他們準備穩定的金屬大環錯合物，此金屬錯合物上的金屬離子除了可與磷酸雙酯鍵配位外，還可活化金屬離子的配位水或胺基，使解離的配位水或胺基可攻擊磷酸雙酯鍵¹⁰。

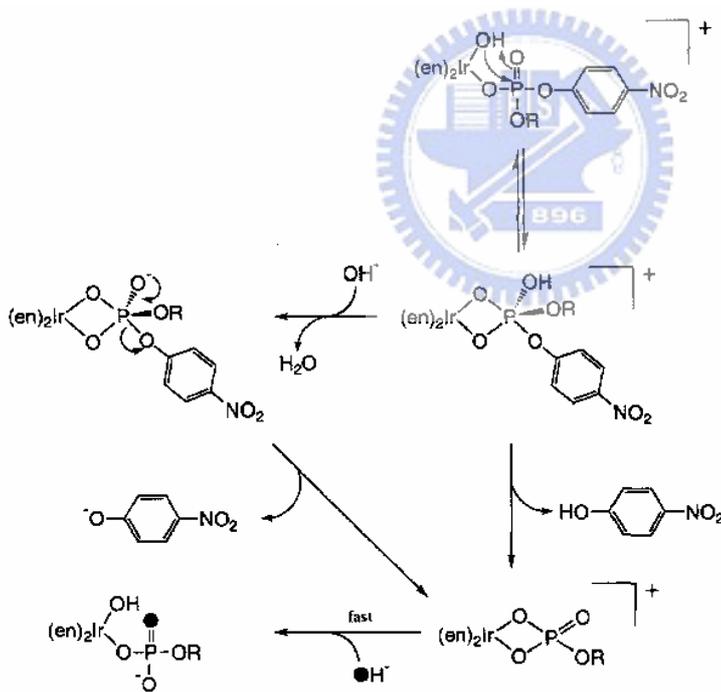


圖 1-6、 Co^{3+} 及 Ir^{3+} 的大環錯合物水解磷酸雙酯鍵可能之機制。

自 1993 年起，Burstyn 以 Cu^{2+} 及三氮九元環為研究材料，研究此類金屬錯合物水解 BNPP 的機制與特性。首先她利用 HPLC 證明此類金屬錯合物具有高度的選擇性，可與磷酸雙酯鍵反應，且 BNPP 的水解速率是 NPP 的 50 倍

左右。除此之外，他也利用實驗證明此類金屬錯合物有 turnover 的現象，且也利用 initial rate 對金屬錯合物濃度的實驗結果作圖，推測溶液中有不具活性的物種產生，綜合前人研究，進一步推測溶液內單體為活性物種，而雙體為不具活性的物種¹¹⁻¹⁴。

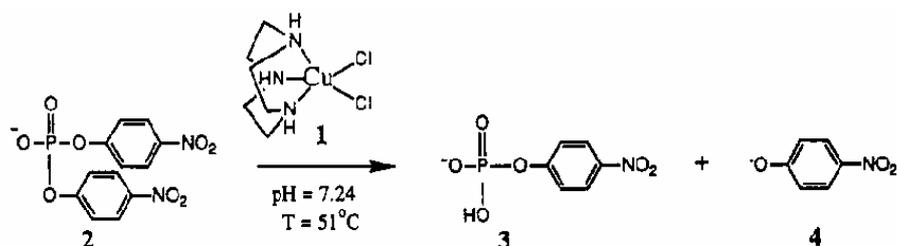


圖 1-7、Cu[9]aneN₃ 水解 BNPP 的反應。

Burstyn 利用 pH 對 rate profile 作圖及滴定資料，互相佐證金屬錯合物 pH=7.3 會有一配位水解離，因而產生水解 BNPP 的活性物種。綜合這些實驗結果，Burstyn 提出以下的反應機制¹²。

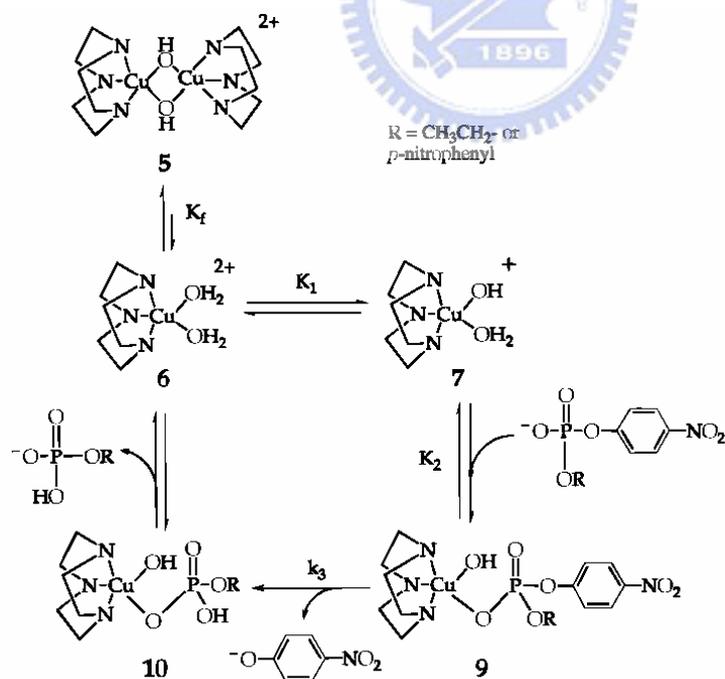


圖 1-8、推測 Cu[9]aneN₃ 水解 BNPP 的反應機制。

之後 Burstyn 繼續相關的研究，她選取三氮九-十一元環為實驗材料，與二

價銅錯合後進行水解 BNPP 的研究，結果發現隨著環穴變大，金屬錯合物的水解速率就會相對性的提升，從九環到十一環足足提升了一個數量級。由金屬錯合物結晶圖的分析結果，當大環環穴越大，金屬離子就越深入環穴中心，而 N-Cu-N 的鍵角就會越大，相對的兩個配位水的鍵角就會減小。由動力學求得的雙體形成常數，也有隨著環穴變大而常數減小的趨勢，於是 Burstyn 推測隨著配位水鍵角的變小，則錯合物在水溶液中形成雙體的立體阻礙越大，使得錯合物隨著環穴變大溶液中單體的組成比例就會增加，因而提升其反應速率¹³。

表 1-1、三氮九-十一元環水解磷酸酯鍵之速率比較。

Table 4. Summary of pK_a Values, Dimer Formation Constants, and Rate Constants for the Hydrolysis of the Activated Phosphodiester BNPP by Various Metal Complexes

	pK_{a1}^a	$K_T (M^{-1})^c$	$k (M^{-1/2} s^{-1})^c$
$Cu([9]aneN_3)^{2+}$	7.3 ^b	13000	2.0×10^{-4}
$Cu([10]aneN_3)^{2+}$	7.6	5300	4.0×10^{-4}
$Cu([11]aneN_3)^{2+}$	8.2	2700	16×10^{-4}

^a This apparent pK_a is *not* the pK_a of the coordinated water, but rather a composite of multiple pH-dependent equilibria.⁵ ^b Data taken from Deal and Burstyn.¹⁶ ^c Reactions were performed at pH 9.2 (buffered with 50 mM CHES) and 50 °C with an ionic strength of 0.1 M (adjusted with NaClO₄). Because K_T is pH-dependent (Scheme 2),^{5,16} the reported K_T values are valid at pH 9.2 only.

2002 年 Burstyn 延續之前的研究，她在三氮九元環的三個二級氮上，接了三個異丙基，此配位子的金屬錯合物的水解效率足足比三氮九元環錯合物快了 10 倍，根據能量上的變化，推測三氮九元環衍生物錯合物在形成雙體是不利的，因而具有活性的單體的比例在水溶液中就增加許多¹⁴。

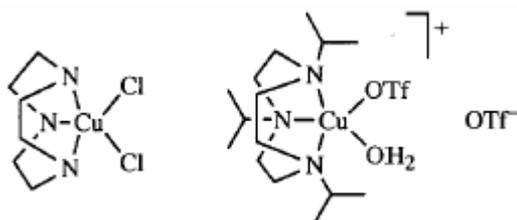


圖 1-9、三氮九元環及其衍生物之結構。

表 1-2、三氮九-十一元環及三氮九元環衍生物其水解磷酸酯鍵反應速率之比

較。

Table 3. Geometric Parameters, Measured pK_a s, Dimer Formation Constants and 1.5-Order Rate Constants for a Series of BNPP Hydrolysis Catalysts

	cone angle ^a (deg)	pK_a^b	K_1^c (M ⁻¹)	$k_{1.5}^c$ (M ^{-1/2} s ⁻¹)
1	102	7.3	13 000	2.0×10^{-4}
Cu([10]aneN ₃)Br ₂	127	7.6	5 300	4.0×10^{-4}
Cu([11]aneN ₃)Br ₂	118	8.2	2 700	1.6×10^{-3}
2	208	8.7	1 400 ^d	6.0×10^{-2}

^a Cone angle analyses was performed using vector algebra applied to the xyz atomic coordinates from the published crystal structures of **1**,⁴¹ Cu([10]aneN₃)Br₂,²⁶ Cu([11]aneN₃)Br₂,²⁶ and **2**.²⁷ ^b Measured at 25 °C and 0.10 M ionic strength; note that at 50 °C the measured pK_a for **2** is 7.9. ^c Values were determined at pH 9.2. ^d Upper limit given: range is from 216 to 1394 M⁻¹ (this work). Data for compounds **1**, Cu([10]aneN₃)Br₂, and Cu([11]aneN₃)Br₂ are taken from the literature.^{21,26}

1996 年 Krämer 等人以雙官能基催化為目標設計配位子，其設計配位子的結構是由 2,2'-bipyridine(bpy) 組成，並在 pyridine 接上 alkylamine 作為一個胺基酸的類似物。兩種銅離子錯合物切割 BNPP 的動力學可得知 L₁Cu 具有較高的切割能力，L₁Cu 的反應速率約為 L₃Cu 的 1000 倍，推測可能是配位子上的胺基類似物有關。磷酸雙酯鍵可以經由金屬錯合物與胺基酸類似物雙重活化，再經由銅離活化後的配位水，進行親核攻擊完成水解反應^{15,16}。

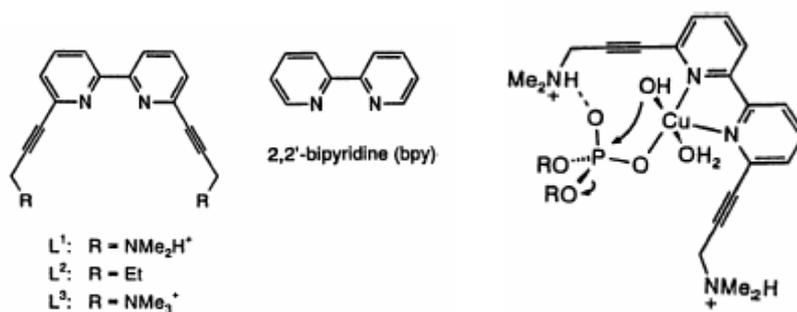


圖 1-10、雙官能基催化之設計配位子結構。

由上例結果顯示，人造水解酶如同天然酵素一樣，多官能基的催化是必須的，而天然的酵素多半有兩個以上的金屬參與催化反應，例如 alkaline phosphate 就是雙金屬活化中心的限制酶。而近期的研究也逐漸由單核金屬錯合物，轉移到多核金屬錯合上，1998 年起 Morrow 就接連發表一系列，以三氮九元環為主

體的雙核人造水解酶。Morrow 利用 meta 或 para-xylene 將兩個三氮九元環連接起來，並經由滴定法得知雙體在 pH=7.3 的環境下，會活化兩個配位水並產生 $\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})^{2+}$ 的物種（單體在 pH=7.3 環境下只有一個配位水解離），雙體錯合物的水解 GpppG 的速率是單體的 100 倍。而雙體錯合物濃度與反應速率實驗結果作圖發現，在起始處有二次趨勢，而高濃度的時候就有飽和的現象，推測金屬錯合物可以與 GpppG 以一比一及二比一的比例進行反應。她推測雙體的反應機制如下，而利用此模型計算出的金屬錯合物以二比一進行反應的一次速率常數為 $1.1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ，而一比一比例反應的一次速率常數為 $4.3 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ ，二比一比例的反應速率是一比一的 20 倍¹⁷⁻¹⁹。

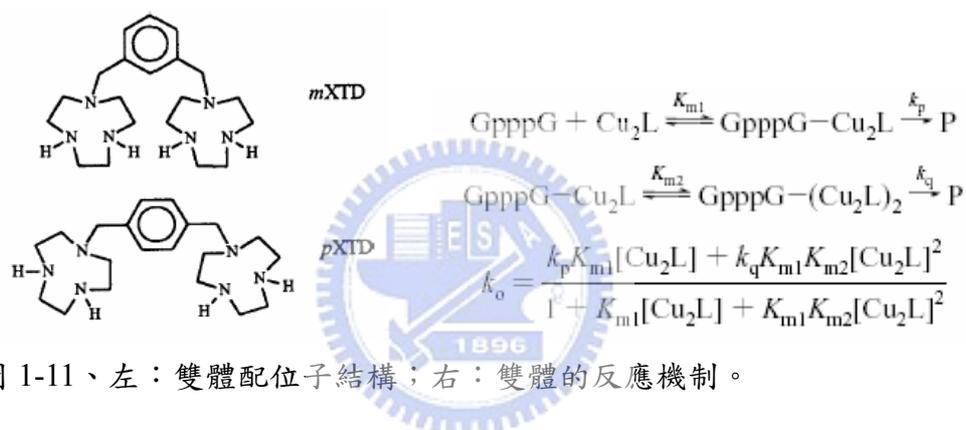


圖 1-11、左：雙體配位子結構；右：雙體的反應機制。

2003 年 Morrow 使用 1,3-dibromo-2-propanol 作為連接橋，將兩個三氮九元環連在一起形成新的雙核配位子，這類的雙體不同於之前發表的雙體，在中性 pH 值下，此新型配位子可與一當量的 Zn^{2+} 形成穩定對稱的錯合物，推測金屬離子就像三明治一般，被兩個三氮九元環夾在中心。而此新型配位子錯合物也展現更快水解磷酸酯鍵的活性，在 pH=7.6、25°C 的條件下水解 HPNP 的動力學實驗結果顯示， $\text{Zn}_2(\text{L}2\text{OH})$ 的二級反應常數是 $\text{Zn}(\text{L}1)$ 的 120 倍，而其他的雙體 (L3-L5) 只有 $\text{Zn}(\text{L}1)$ 的三到五倍，這也暗示著 $\text{Zn}_2(\text{L}2\text{OH})$ 的兩個金屬離子可藉由協同作用來穩定 HPNP 的中間過渡態，並且進而加速水解 HPNP¹⁸。

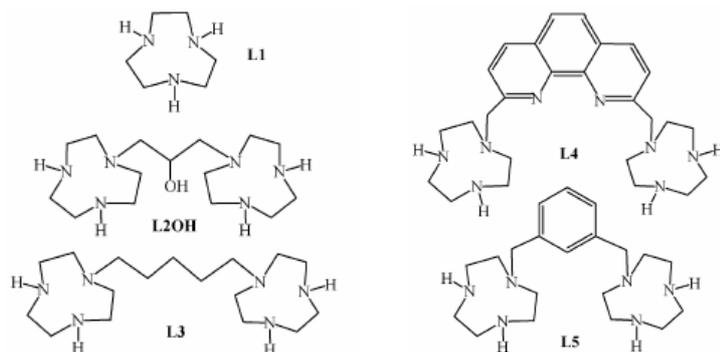


圖 1-12、三氮九元環雙核配位子之結構。

表 1-3、三氮九元環雙核配位子水解 HPNP 之反應速率比較。

Table 1. Rate Constants for the Cleavage of HPNP by Zn(II) Complexes at pH 7.6, 25 °C, and $I = 0.10$ M NaNO₃

catalyst	$k_{Zn} (M^{-1} s^{-1})$	relative k^a
Zn ₂ (L2O)	25×10^{-2}	120
Zn ₂ (L3)	1.1×10^{-2}	5
Zn ₂ (L4)	0.89×10^{-2}	4
Zn ₂ (L5)	0.58×10^{-2}	3
Zn(L1)	0.21×10^{-2}	1

2004 年 Morrow 延續前一年的對於新型配位子的研究，藉由與不同過渡元素錯合，研究對於水解磷酸酯鍵的影響，結果發現在 pH=9.3、25°C 的條件下，Cd₂(L2O) 的水解 HPNP 的速率，足足比 Cu₂(L2O) 增加了三個級數 [Cd₂(L2O)(2,8M-1S-1) > Zn₂(L2O)(0.68M-1S-1) > Cu₂(L2O)(0.0041M-1S-1)]。除此之外，Cd₂(L2O) 也展現不同另外兩個金屬錯合物的特性，Cd²⁺ 要與配位子形成穩定的雙核配位子必須在高 pH 值環境下 (pH=10.4)，而 Cu²⁺ 及 Zn²⁺ 卻只要在中性環境下就可形成穩定的雙核配位子。而進一步 Cd₂(L2O) 水解 HPNP 研究指出，雙金屬核物種是比單金屬核物種更有效的催化物種²⁰。

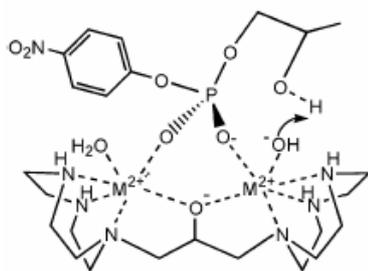


圖 1-13、雙金屬核配位子水解機制。

除了以自然界常見的 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 及 Cd^{+2} 等一般過渡元素為主題，研究其金屬錯合物水解磷酸酯鍵的成效外，以鑰系金屬為主題的研究也是引起科學家很大的興趣。鑰系金屬離子催化水解磷雙酯鍵的成效是很明顯的，特別是與過渡金屬及鹼土金屬相比，其原因是在於鑰系金屬離子具有較高的氧化態、電荷密度、較多的配位數及快速的配位子交換速率。這些特性使得鑰系金屬非常適合作為一個金屬離子活化中心，可惜的是，鑰系金屬在常態下非常不穩定，很難準確地知道其配位數及構型，而這也使得鑰系金屬在研究上更加困難^{20,21}。

1992 年 Morrow 發表第一篇鑰系金屬錯合物具有催化水解 RNA 的例子，與大環錯合後的鑰系金屬具有非常高的熱力學穩定性。之後 Morrow 更進一步研究，她發現鑰系金屬的催化能力比一般過渡金屬還來的好²²，推測是因為鑰系金屬具有更高的路易斯酸的特性，但進一步研究結果卻指出，鑰系金屬錯合物的催化效果並非單純遵循路易斯酸強度增強而增加，這暗示還有其他因素影響著催化效果。此外，Morrow 推測鑰系金屬的催化機制與一般過渡金屬催化機制是相似的。

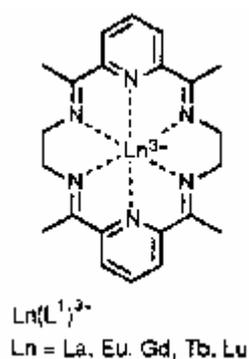


圖 1-14、與鑰系金屬形成錯合物之配位子結構。

表 1-4、過渡金屬錯合物與鑰系金屬錯合物之反應速率比較。

Table I. Apparent-Second-Order Rate Constants for the Transesterification of 1 in Water at 37 °C (pH 6.85) by Metal Ions

metal ^a	$k_2,^b \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	metal ^a	$k_2,^b \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
La ³⁺	1.3×10^{-1}	Pb ²⁺	2.0×10^{-1}
Nd ³⁺	2.6×10^{-1}	Cu ²⁺	4.0×10^{-2}
Eu ³⁺	3.2×10^{-1}	Zn ²⁺	1.8×10^{-2}
Gd ³⁺	5.4×10^{-1}	Co ²⁺	2.6×10^{-3}
Tb ³⁺	5.7×10^{-1}	Mn ²⁺	2.4×10^{-3}
Yb ³⁺	4.0×10^{-1}	Ni ²⁺	1.6×10^{-3}
Lu ³⁺	1.7×10^{-1}	Mg ²⁺	7.4×10^{-5}
		Ca ²⁺	4.8×10^{-5}

1996 年，Morrow 發現將八配位的 TCMC 和十配位的 La³⁺ 錯合後，具有切割 RNA 的效果，可是若和九配位的 Eu³⁺ 錯合後就失去了催化效力，之後又將 Eu³⁺ 與七配位的 NBAC 錯合，結果發現此錯合物具有切割能力，因而推測金屬錯合物必須具有兩個配位水，才會具有切割磷酸雙酯鍵的功效²³。

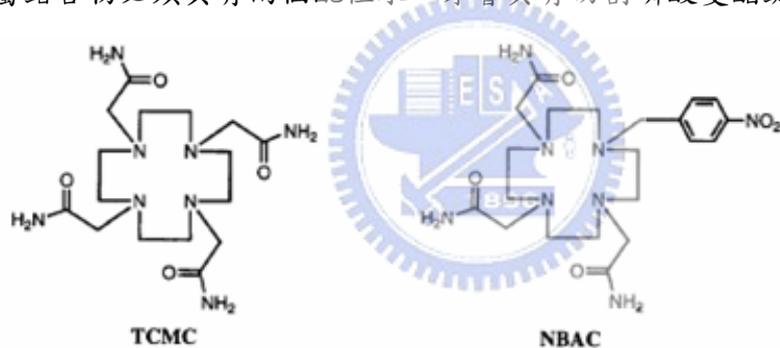


圖 1-15、八配位的 TCMC 與七配位的 NBAC 配位子結構。

自 1993 年起，鑰系金屬中的 Ce⁴⁺ 就一直受到 Komiyama 及 Chin 等團隊的注意。Chin 發現鑰系金屬中，只有 Ce³⁺ 可以在 pH=8.2、37°C 的條件下水解 dApdA ($k_{\text{obs}}=6.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)。可是若用氮氣將實驗系統與空氣隔絕後，發現 Ce³⁺ 就失去了水解能力，故 Chin 推測 Ce³⁺ 必須被空氣中的氧分子氧化成 Ce⁴⁺ 後，才會具有水解 dApdA 的能力²⁴⁻²⁶。

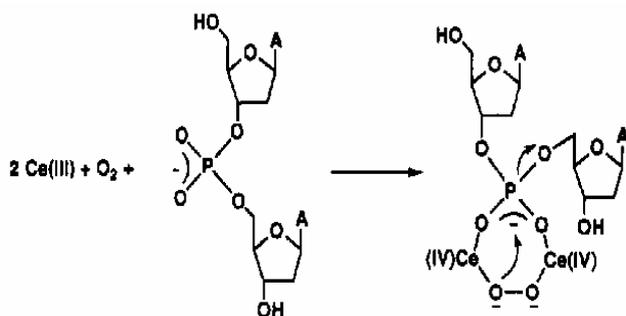


圖 1-16、 Ce^{4+} 水解 dApdA 的機制。

Komiyama 在 $\text{pH}=7.0$ 、 50°C 的條件下，進行 Ce^{4+} 水解 TpT 的實驗，雖然 Ce^{4+} 在此環境下會形成類似膠狀的物質，但仍能保有水解 TpT 的效力 ($k=5.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$)，TpT 的半生期為 3.6 小時。經由動力學及電位滴定研究，在此環境下，發現 $[\text{Ce}(\text{OH})(\text{OH}_2)_x]^{3+}$ 為最主要的催化活性物種。之後 Komiyama 率先發表具有特定辨識能力的完全人造限制酶，他將一段 19 個鹼基對的 DNA 序列，連接在鑰系金屬錯合物上，此人造限制酶可經由 DNA 序列的配對而進行特定位置的切割作用^{7,27}。

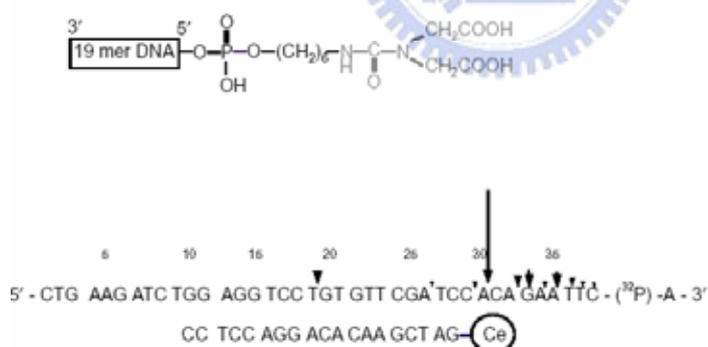


圖 1-17、利用鑰系金屬錯合物合成具有特定位置切割作用之人造限制酶。

除了共價鍵結一段 DNA 序列可賦予人造水解酶選擇性外，非共價性賦予選擇性的策略也已受到眾人的注意^{28,29}。2003-2004 年 Komiyama 將 oligoamine 與 acridine 經由一長鏈連接起來，這類物質中的 acridine 可選擇性的與單股 DNA 進行鍵結，而 oligoamine 可與 Ce^{4+} /EDTA 一起協同作用，能有效又選擇性的水解單股 DNA。

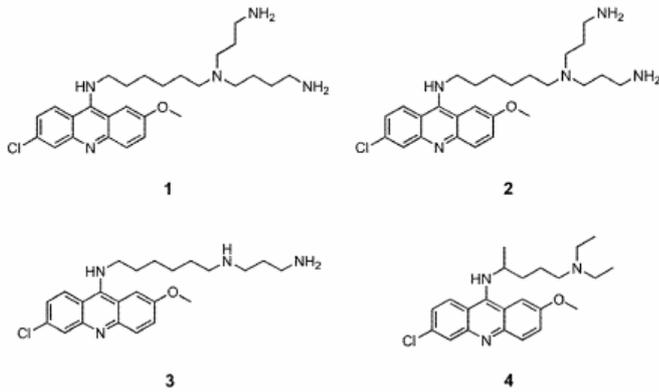


圖 1-18、oligoamine-acridine conjugates 之結構。

Komiyama 利用上列不等長的單股 DNA 序列，使 99 個鹼基的單股 DNA 序列產生單股間隙，如下圖 1-19 所示，並經由實驗證明，有外加 oligoamine-acridine conjugates 的實驗組別， $Ce^{4+}/EDTA$ 具有選擇性切割 DNA 的情形。除此之外，另外一個實驗也證明 oligoamine-acridine conjugates 具有促進 DNA 水解的效果。

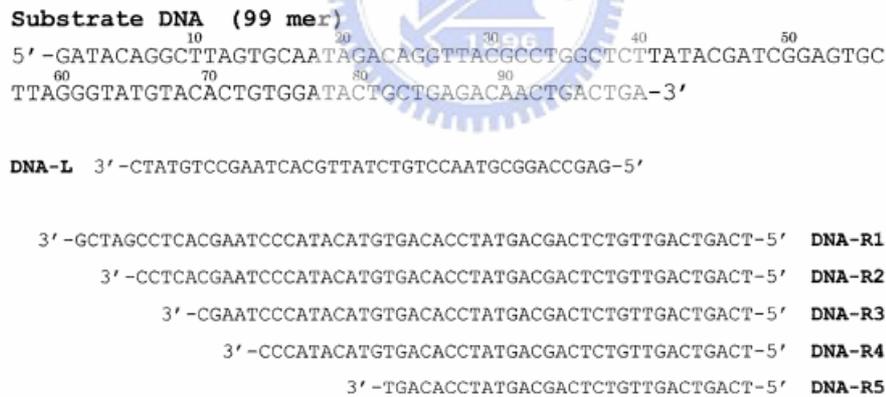


圖 1-19、利用不等長的單股 DNA 序列透過鹼基配對產生單股間隙。

1998 年起，Yatsimirsky 發表鏷系金屬與 BTP(Bis-Tri propane) 錯合後切割 BNPP、NPP 及 NPA 的研究^{30,31}。

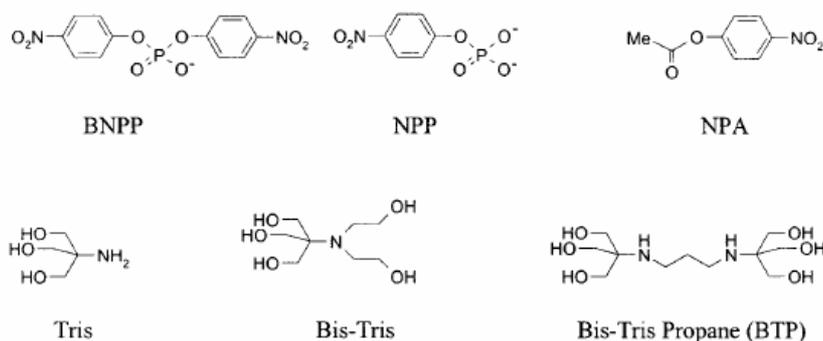


圖 1-20、BTP(Bis-Tri propane) 與 BNPP、NPP 及 NPA 之結構。

在 25°C、pH=7-9 的條件下，他用電位滴定法決定水溶液中的物種組成，水溶液一共有四種雙核物種，分別帶有 2、4、5、6 個 hydroxides。經由動力學研究的推導，可決定出其速率定律式，並配合物種分配圖，以多重回歸計算出各物種的速率常數，其結果顯示隨著物種的 hydroxides 越多，其反應速率就越快，而在相同的 hydroxides 數目下， $\text{La} > \text{Pr} > \text{Nd} > \text{Eu} > \text{Gd} > \text{Dy}$ 。2005 年，更進一步研究以 Ce^{4+} 為主的鐳系金屬離子錯合物，發現在不同 pH 值條件下，溶液中會有不同物種組成，而主要有效的催化物種也會跟著變動，例如當溶液 pH 由 7 降到 5 時，則溶液內的物種就會由 $\text{Ce}_4(\text{OH})_{15}^+$ \rightarrow $\text{Ce}_4(\text{OH})_{14}^{2+}$ \rightarrow $\text{Ce}_4(\text{OH})_{13}^{3+}$ ，物種催化能力隨著帶電性而增強³²。

雖然鐳系金屬是很有效的 DNA 切割試劑，可是它易在高 pH 值環境下形成沉澱，於是科學家利用大環配位子、胺基酸或 buffer 來穩定金屬離子，但鐳系金屬與大環的錯合方式及配位化學難以了解^{20,21}，而利用胺基酸或 buffer 來穩定金屬離子的方法又令人質疑。以 cyclen 為主體的四取代基大環，已在 MRI 的研究上證實對鐳系金屬有很高的穩定常數³³，近年來也被應用在人造水解酶的設計。Morrow 在 1996 年發表以 cyclen 為主體，合成酸基、胺基及醇基等四取代基衍生物，進行了許多鐳系金屬錯合物切割磷酸雙酯鍵的研究，證實這些金屬錯合物不僅具有高穩定性，對 DNA 或 RNA 也有非常高的催化效力²³。

2005 年 Thorfinnur 發表一類以 cyclen 為主體的人造核酸水解酶，他將新

合成的配位子與 La^{3+} 及 Eu^{3+} 錯合後，在 37°C 、中性環境進行催化 HPNP 水解的動力學實驗，結果發現 La^{3+} 錯合物的催化速率會隨著 pH 值上升，之後又在 $\text{pH}=8.5$ 又下降， Eu^{3+} 的錯合物並不會隨著 pH 改變而水解速率有明顯的變化。他推測可能是 La^{3+} 比 Eu^{3+} 多了一個配位數，故造成這個結果，以下為其所推論的 La 水解模型³⁴。

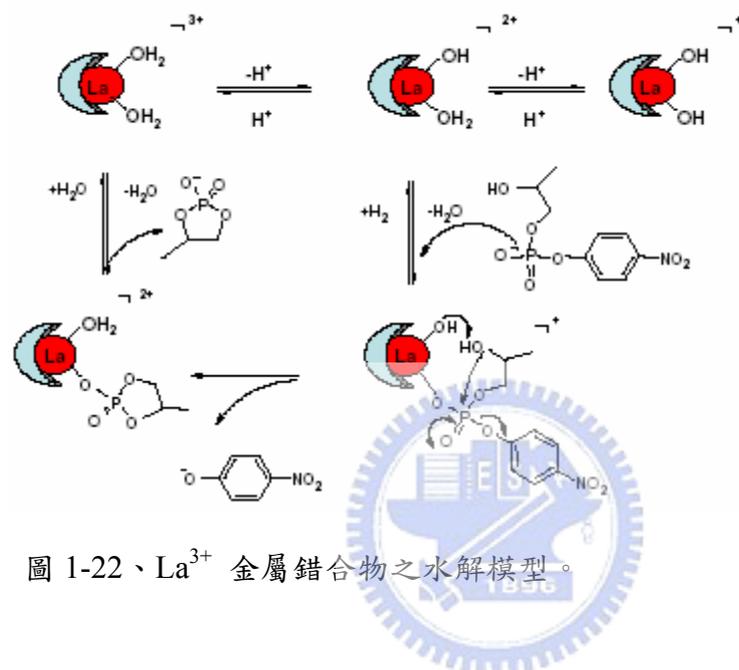


圖 1-22、 La^{3+} 金屬錯合物之水解模型。

除了四取代基的四氮十二元環研究外，也有科學家進行其他衍生物的研究，例如雙核金屬錯合物的研究³⁵，除此之外，其他同類型的配位子也有發展，Markus 在 1996 年簡短的發表過關於 LnDO3A 的研究³⁶，結果指出 LnDO3A 能提升 HPNP 分解速率達數千倍。本實驗室之前是以六配位的 DO2A 為研究主體，進行了一連串 LnDO2A^+ 與其它鑰系金屬配位子的動力學實驗。首先進行不同鑰系金屬與 DO2A 錯合後水解 BNPP 的效率比較，發現 EuDO2A^+ 具有最好的水解效力；再藉由 EuDO2A^+ 、 EuK21DA^+ 及 EuEDDA 水解 BNPP 的實驗得知，配位水越多，其金屬錯合物的水解效力就越好；藉由 EuDO2A^+ 與 EuHEDTA 的水解 BNPP 實驗，可得知錯合物的帶電性會影響金屬錯合物對磷酸雙酯鍵的水解效果³⁷。

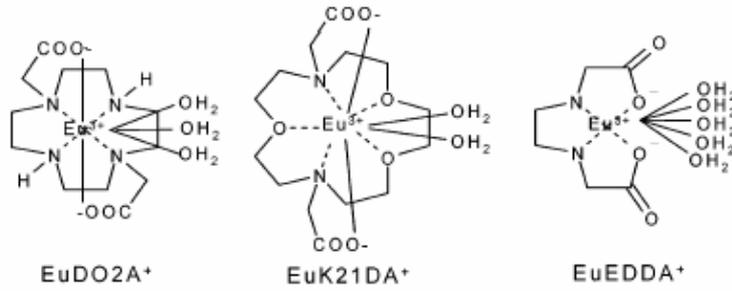


圖 1-23、本實驗室過去研究之 Eu^{3+} 與大環配位子形成錯合物之結構。

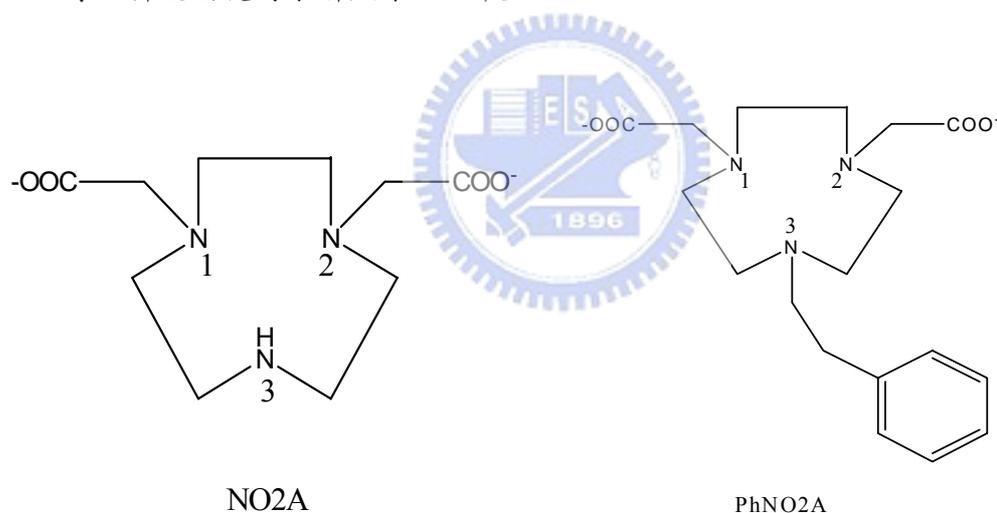
表 1-5、各種鏷系金屬錯合物於不同 pH 環境下之速率比較。

Table 2. Fitted K_h and $k_{\text{LnL(OH)}}$ Values for the BNPP Hydrolysis by Various Lanthanide Complexes^a

complex	$\text{p}K_h$	$k_{\text{LnL(OH)}}$	R^2	pH range
EuDO2A ⁺	8.4 ± 0.3	4.67×10^{-2}	0.979	6.30–8.74
LaDO2A ⁺	8.4 ± 0.2	1.71×10^{-2}	0.969	6.83–8.69
YbDO2A ⁺	9.4 ± 0.3	3.03×10^{-3}	0.981	8.70–10.90
EuK21DA ⁺	7.8 ± 0.1	1.31×10^{-4}	0.988	6.56–9.90
EuEDDA ⁺	9.0 ± 0.3^b	4.00×10^{-1}	0.980	7.00–8.40
EuHEDTA	10.1 ± 0.2	4.10×10^{-3}	0.980	8.43–11.90

1-3 研究目的

1. 由前人對於 EuDO2A^+ 、 EuK21DA^+ 及 EuEDDA 水解 BNPP 的實驗可推測，配位水越多的金屬錯合物，其水解效率就會越高³⁷。因此我們欲研究配位子 NO2A ，由於其配位數比 DO2A 少一個，故推論與鑰系金屬錯合後， LnNO2A^+ 形成的配位水應比 LnDO2A^+ 還要多。
2. 由前人的研究可推測 LnNO2A^+ 會在水溶液內產生多核物種，此多核物種可能會因構型或配位水的關係而失去水解磷雙酯鍵的活性。由 Bustyn 的研究得知，若外加一個具有立體張力的取代基，將可抑制多核物種的形成¹⁴。
3. 模擬天然酵素的雙核金屬錯合物一直被認為更具有水解磷酸酯鍵的功效¹⁷，¹⁸，因此我們將試著合成多種雙核配位子，以研究雙體錯合物及單體錯合物對於磷酸酯鍵的水解效果之比較。

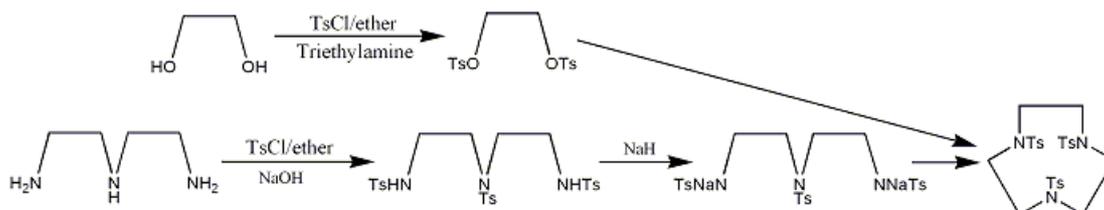


第二章、配位子的合成

2-1

1, 4, 7-tri(p-toluenesulfonyl)-1, 4, 7-triazacyclononane 的合成^{38, 39}

Scheme. 1



1、O',O''-bis(p-toluenesulfonato)ethane

取 0.1 mol 約 6.207g 的 ethylene glycol 及 100 ml 的 triethylamine，將兩者倒入圓底瓶內冰浴攪拌拔氫，隨即秤取 0.2 mol 約 38.13g 的 p-toluenesulfonyl chloride，將之溶於 200 ml 的乙醚中，置入等壓漏斗中並逐滴加入圓底瓶中與 ethylene glycol 攪拌反應。控制滴入時間在 3 至 4 小時範圍內，反應完成後用電動攪拌子強力攪拌 10 小時，抽氣過濾溶液可得大量白色粉末，先用二次水沖洗過濾所得的白色粉末，隨即再用大量 ethanol 沖洗 2 至 3 次，最後剩下的白色粉末用 300 至 400 ml 的 hot ethanol 做再結晶，即可得白色長片狀固體。

產率：87%

熔點：120–122°C

NMR(CDCl₃, 500 MHz)：

¹H：δ 2.45(-OCH₂CH₂O-), δ 4.18(ArCH₃), δ 7.25, δ 7.32, δ 7.34, δ 7.71, δ 7.73(aromatic hydrogen)

¹³C：δ 21.66(ArCH₃), δ 66.66(-OCH₂CH₂O-), δ 127.95, δ 129.95, δ 132.33, δ 145.27(aromatic carbon)

2、N,N',N''-tri(p-toluenesulfonyl)diethylenetriamine

取 0.3 mol 約 12g 的 Sodium hydroxide，並將之溶於 100 ml 的二次水中，秤取 0.1 mol 約 10.317g 的 diethyltriamine，將 sodium hydroxide 水溶液與 diethylamine 一起置入圓底瓶內冰浴攪拌以拔氫。秤取 0.3 mol 約 57.2g 的 p-toluenesulfonyl chloride，將之溶於 300 ml 的乙醚中，置入等壓漏斗中逐滴加入圓底瓶內與 diethyltriamine 反應。控制滴入時間在 3 至 4 小時範圍內，反應完後用電動攪拌子強力攪拌 10 小時，攪拌完後抽氣過濾可得大量白色稠狀固體，先用二次水沖洗過濾所得的白色稠狀物，隨即再用大量 ethanol 沖洗 2 至 3 次，最後剩下的白色稠狀物用 1L-1.2L 的 hot ethanol 做再結晶，可得的白色針狀固體。

產率：72%

熔點：173-175°C

MS(ESI)：M/Z 566.1([M+H⁺])

3、1, 4, 7-tri(p-toluenesulfonyl)-1, 4, 7-triazacyclononane

秤取 22g 化合物 1(約 0.0388mol)並溶於 200 ml 的 DMF 中，秤取 7.76g(約 0.194 mol)的 Sodium hydride，分多次緩慢地將 NaH 倒入溶有化合物 1 的 DMF 溶液中攪拌反應，待溶液不再產生氣泡後，以抽氣過濾溶液得澄清橙色濾液。秤取 14.37g 化合物 2(約 0.0388 mol)並溶於 200 ml DMF 中，置入等壓漏斗中逐滴加入拔氫後的 1 溶液中，在 110°C 油浴中攪拌反應 10 小時，溶液會漸漸由黃橙色轉變為紅橙色。將溶液濃縮到剩約 100 ml 時，會有白黃色固體析出，將此溶液慢慢滴入劇烈攪拌的二次水中，會有白色固體析出，過濾此固體並且用大量二次水沖洗，剩下的白色固體再用等比例的 chloroform / ethanol 做再結晶，可得白色粉末固體。

產率：71%

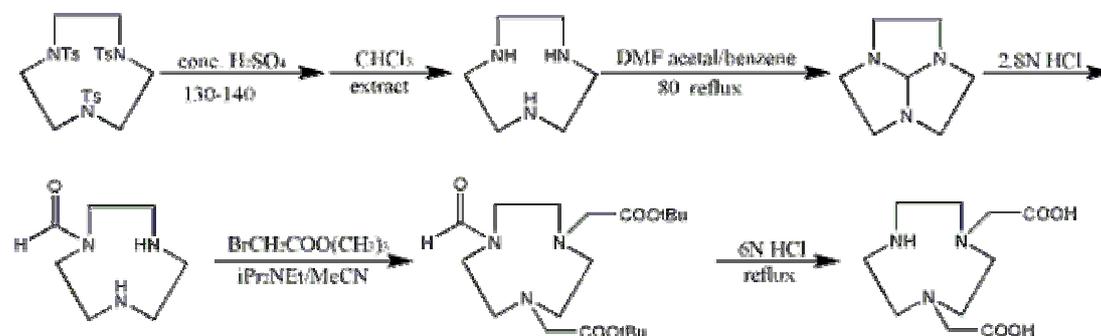
熔點：220-223°C

MS(ESI)：M/Z 592.1([M+H⁺])

2-2

1, 4-bis(carboxymethyl)-1, 4, 7-triazacyclononane 的合成^{40, 41}

Scheme. 2



4、1, 4, 7-triazacyclononane

秤取 15g 的化合物 3，取 40 ml 濃硫酸(macrocycle : H₂SO₄=1g : 2-3ml)，將化合物 3 溶於 40 ml 濃硫酸中，並在 130-140°C 油浴中反應一天，溶液會由橙色轉為黑色。將黑色溶液倒出，利用鹽類不溶於有機溶劑的特性，以 300 ml 的乙醚重複三次析出灰白色固體(需小心慢慢將乙醚倒入黑色溶液中)，抽氣過濾得灰白色固體，並用 100 ml 二次水將固體溶解，在 80°C 加熱下加活性炭脫色(也可加少許碳酸鋇以去除多於硫酸)，過濾後可得澄清淡黃綠色溶液，用 12N 的氫氧化鈉水溶液將溶液的 pH 值調到 12 以上(約在 pH=11 時，溶液會轉變為紫色)。用 100 ml 的 chloroform 重複三次作萃取，收集有機層，並加硫酸鎂去水，靜置後重力過濾得澄清淡黃綠色溶液，將溶液抽乾後得淡黃綠色油狀物約 2g。

產率：76%

EA : Anal. Calcd for C₆H₁₈N₃Cl₃: N, 17.62; C, 30.20; H, 7.60. Found: N, 17.39; C, 30.58; H, 7.68.

MS(ESI) : M/Z 130.1([M+H⁺])

NMR(D₂O, 500 MHz) :

¹H : δ 3.52(-NCH₂CH₂N-)

¹³C : δ 42.12(-NCH₂CH₂N-)

所有分析數據皆為 1, 4, 7-triazacyclononane trihydrochloride salt 形式

5、1, 4, 7-triazacyclo[5, 2, 1, 0⁴, 10]decane

秤取 2 g 化合物 4(約 0.0155 mol)，溶於 30 ml benzene 中，於 80°C 油浴及氮氣系統下慢慢地用針筒將 1.85g 的 dimethylformamide dimethyl acetal(約 0.0155 mol) 加入上述溶液中反應。反應三個小時後，溶液會漸漸由淡淡澄清黃綠色轉變為澄清紅橙色，將溶液抽乾後可得約 1.7g 的橙色油狀物。

產率：74%

NMR(CDCl₃, 300M HZ)：

¹³C：δ 50.05(-NCH₂CH₂N-), δ 102.47(-NCHN-)

6、1-formyl-1, 4, 7-triazacyclononane

取 1.7g 化合物 5(約 0.0122 mol)，溶於 10 ml 2.8N 的 HCl 溶液中，於室溫下攪拌水解 8 小時。反應完成後馬上冰浴冷卻，之後用 12N 的氫氧化鈉水溶液調整其 pH 值至大於 13，再用 20 ml 的 chloroform 萃取三次，收集有機層，加硫酸鎂去水靜置後，重力過濾得澄清濾液，將濾液抽乾可得澄清淡橙色油狀物 1.2g。

產率：57%

NMR(CDCl₃, 300 MHz)：

¹³C：δ 46.69, δ 48.25, δ 48.75, δ 49.32, δ 49.84, δ 52.72(-NCH₂CH₂N-), δ

163.94(-CHO)

MS(ESI)：M/Z 274.2, 330.3, 386.2([M+H⁺])

274.2 為兩個-tBu 都斷裂的形式，330.3 為一個-tBu 斷裂的形式，386.2 是都沒有斷裂的形式，三者的訊號都很高。

EA：Anal. Calcd for C₁₉H₃₅N₃O₅: N, 10.90; C, 59.20; H, 9.10. Found: N, 10.67; C, 59.02; H, 8.99.

第二次氮的實驗值太低，與第一次誤差太大，因此不予於考慮

7、1-formyl-4, 7-bis(tert-butoxycarbonylmethyl)-1, 4, 7-triazacyclononane

取 1.2g 化合物 6(約 7.63 mmol), 溶於 30 ml acetonitrile 中, 稱取 2.96g(約 22.9 mmol)的 N, N'-diisopropylethylamine, 將之加入上述的 acetonitrile 溶液中拔氫。稱取 4.47g(約 22.9 mmol)的 *tert*-butyl bromoacetate, 在氮氣系統及 40°C 水浴下逐滴加入, 反應 14 小時後, 將水浴溫度調升到 60°C 反應 8 小時, 溶液會由橙色轉為紅橙色。將溶液抽乾後加 50 ml chloroform 溶解固體, 用 50 ml 的二次水進行萃取清洗三次, 取有機層並加硫酸鎂去水, 靜置後重力過濾得橙色澄清濾液, 抽乾溶液得紅橙色油狀物, 利用 silica gel 進行管柱層析純化, 動相為純 EA, 最後可得淡橙色油狀物 2.9g。

產率: 42%

NMR(CDCl₃, 500 MHz):

¹H: δ 1.45, δ 1.46(s, -CH₃), δ 2.67(2H, t, -NCH₂CH₂N-), δ 2.74(2H, d, -NCH₂CH₂N-), δ 2.97(2H, d, -NCH₂CH₂N-), δ 3.18(2H, d, -NCH₂CH₂N-), δ 3.28(6H, s, -NCH₂CH₂N- and -NCH₂-), δ 3.49(2H, d, -NCH₂CH₂N-), δ 8.04(1H, s, -CHO)

¹³C: δ 28.10(-CH₃), δ 47.03, δ 50.12, δ 53.81, δ 54.47, δ 54.76, δ 57.83(-NCH₂CH₂N-), δ 58.40, δ 58.85(-NCH₂-), δ 80.79, δ 80.92(-C(CH₃)₃), δ 163.70(-CHO), δ 171.12, δ 171.26(-COOtBu)

8、1, 4-bis(carboxymethyl)-1, 4, 7-triazacyclononane

配製 6N HCl 水溶液約 40 ml, 將化合物 7 溶於 6N HCl 溶液中 reflux 一天, 水解完後將溶液抽乾可得橙色鹽類固體, 利用陽離子交換樹脂純化。

EA: Anal. Calcd for C₁₀H₂₁N₃O₄Cl₂: N, 13.21; C, 37.74; H, 6.65. Found: N, 12.91; C, 37.88; H, 6.66.

MS(ESI): M/Z 246.2([M+H⁺])

NMR(D₂O, 500 MHz):

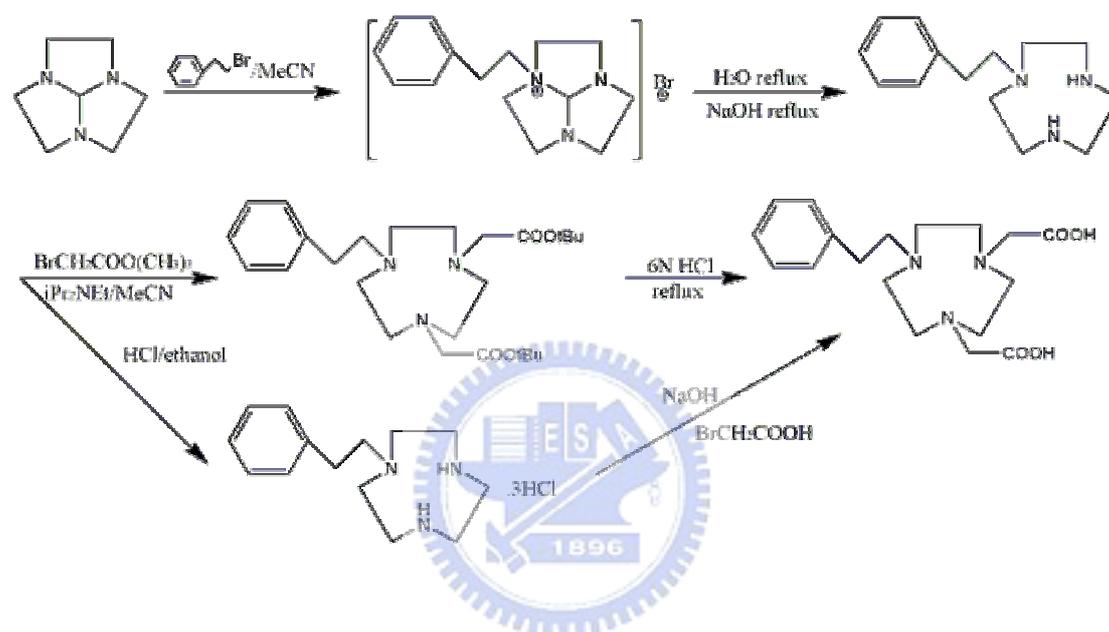
^1H : δ 3.28, δ 3.41, δ 3.45(-NCH₂CH₂N-), δ 3.84(-NCH₂-)

^{13}C : δ 41.44, δ 48.76, δ 49.44(-NCH₂CH₂N-), δ 55.37(-NCH₂), δ 171.00(-COOH)

2-3

1-phenethyl-4, 7-bis(carboxymethyl)-1, 4, 7-triazacyclononane 合成^{18, 40, 42}

Scheme. 3



9、1-phenethyl-1, 4, 7-triazacyclononane

秤取 0.0144 mol 約 2g 的化合物 5，將之溶於 30 ml 的 acetonitrile 中，秤取 0.0144mol 約 2.66g 的 2-phenylethyl bromide，於室溫及氮氣系統下將 2-phenylethyl bromide 慢慢加入上述 acetonitrile 溶液中與之反應。反應 24-36 小時後將溶液抽乾，用 50 ml 的二次水將油狀物溶解，接著用 50 ml 的乙醚萃取兩次，取水層溶液 reflux 十二小時，之後再加氫氧化鈉將溶液調配成 2N 的水溶液後繼續 reflux 一天。靜置冷卻後用 50 ml 的 chloroform 進行萃取三次，收集有機層並加硫酸鎂去水，靜置後重力過濾，抽乾可得澄清淡橙色油狀物約 1.34g。

產率：39%

NMR(CDCl₃, 300 MHz) :

^{13}C : δ 34.03, δ 58.20(ArCH₂CH₂N-), δ 46.12, δ 46.24, δ 52.15(-NCH₂CH₂N-), δ

125.80, δ 128.15, δ 128.39, δ 140.33(aromatic carbon)

10、1-phenethyl-1, 4, 7-triazacyclononane trihydrochloride salt

配製 12N HCl : ethanol = 1 : 2 的 75 ml 混合溶液，將化合物 9 溶於此混合溶液中，並在室溫下攪拌 3 小時，會有白色沉澱析出，抽氣過濾出白色固體後，再用 ethanol 沖洗並乾燥之，可得約 1.5g 白色粉末。

產率：73%

熔點：200°C

EA : Anal. Calcd for $C_{14}H_{26}N_3Cl_3 \cdot 0.7H_2O$: N, 11.83; C, 47.32; H, 7.77. Found: N, 12.05; C, 47.25; H, 7.70.

MS(ESI) : M/Z 234.2([M+H⁺])

NMR(D₂O, 500 MHz) :

¹H : δ 2.78, δ 2.91(ArCH₂CH₂-), δ 2.98, δ 3.20, δ 3.42(-NCH₂CH₂N-), δ 7.16, δ 7.18, δ 7.19, δ 7.21, δ 7.24, δ 7.26, δ 7.27(aromatic hydrogen)

¹³C : δ 30.30, δ 43.38(ArCH₂CH₂-), δ 41.96, δ 47.34, δ 56.06(-NCH₂CH₂N-), δ 126.54, δ 128.80, δ 128.87, δ 139.49(aromatic carbon)

11、1-phenethyl-4, 7-bis(tert-butoxycarbonylmethyl)-1, 4,7-triazacyclononane

秤取 0.00574 mol 約 1.34g 的化合物 9 及兩當量的 iPr₂NEt，將兩者混合溶於 20 ml 的 acetonitrile 中，秤取約為 1.5 當量的 *tert*-butyl bromoacetate，在氮氣系統及 40°C 的水浴下將 *tert*-butyl bromoacetate 慢慢加入溶液中與化合物 9 反應 14 小時，之後升溫到 60°C 再攪拌反應 8 小時，此時溶液會由橙色轉變為紅橙色。將溶液抽乾並加 50 ml 的 chloroform 將固體溶解，用 50 ml 二次水萃取三次，取有機層並加硫酸鎂去水，靜置後重力過濾抽乾濾液可得紅橙色油狀物，再將此油狀物利用 silica gel 進行純化，動相為 EA : MeOH = 9 : 1，最後可得 0.78g 橙色油狀物。

產率：33%

NMR(CDCl₃, 300 MHz)：

¹³C：δ 26.98(-CH₃), δ 29.99, δ 55.53(ArCH₂CH₂N-), δ 46.38, δ 49.69, δ 51.34
(-NCH₂CH₂N-), δ 55.97(-NCH₂-), δ 80.37(-OC(CH₃)₃), δ 125.91, δ 127.63, δ 127.97,
δ 135.39(aromatic hydrogen), δ 169.51(-COO-)

12、1-phenethyl-4, 7-bis(carboxymethyl)-1, 4, 7-triazacyclononane

a. 將化合物 11 溶於 30ml 6N HCl 溶液中 reflux 一天，將溶液抽乾後可得橙色鹽類固體，將固體溶於少量二次水中，利用陽離子交換樹脂進行純化，最後可得約 0.6g 的白色固體。

產率：76%

b. 取 0.00438 mol 約 1.5g 化合物 10 及三當量的 bromoacetate，將兩者混合溶於 25 ml 的二次水中，利用 6N 的氫氧化鈉水溶液維持反應溶液的 pH 值於 10.5-11 之間，並於 70°C 的油浴下反應三天。反應完後用 6N HCl 將溶液的 pH 值調至 3 左右，將溶液抽乾後可得到橙色固體，之後用 50 ml 甲醇將固體沖洗溶解，抽氣過濾得橙色濾液，並將其溶劑抽乾後可得橙色固體，將橙色固體溶於少量二次水後，利用陽離子交換樹脂純化之，最後可得約 1.1g 白色固體。

EA: Anal. Calcd for C₁₈H₂₉N₃O₄Cl₂·2H₂O: N, 9.17; C, 47.16; H, 7.27. Found: N, 9.27; C, 47.16; H, 7.20.

MS(ESI)：M/Z 350.2([M+H⁺])

NMR(D₂O, 500 MHz)：

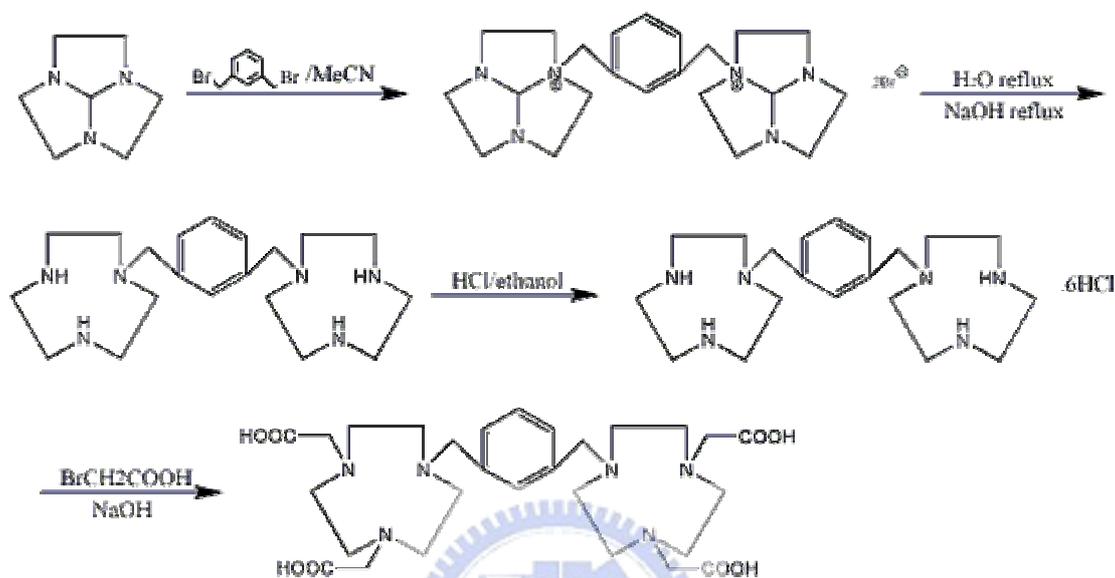
¹H: δ 3.07, δ 3.31, δ 3.54(-NCH₂CH₂N-), δ 3.24, δ 3.62(ArCH₂CH₂N-), δ 7.25, δ 7.26,
δ 7.31, δ 7.33, δ 7.34(aromatic hydrogen)

¹³C：δ 27.34, δ 53.92(ArCH₂CH₂N-), δ 45.98, δ 47.50, δ 48.50(-NCH₂CH₂N-), δ
55.44(-NCH₂-), δ 124.90, δ 126.18, δ 126.52, δ 133.24(aromatic carbon), δ
171.00(-COOH)

2-4

1, 2 or 1, 3-bis[4, 7-bis(carboxymethyl)-1, 4, 7-triazacyclonon-1-ylmethyl]benzene 合成⁴²⁻⁴⁶

Scheme. 4



13、1, 2 or 1, 3-bis(1, 4, 7-triazacyclonon-1-ylmethyl)benzene

將 0.0108 mol 約 1.5g 的化合物 5 溶於 50 ml 的 acetonitrile 中，秤取約為 0.425 當量的 m 或 o-xylene dibromide，並將之溶於 5 ml 的 acetonitrile，於氮氣系統及室溫下慢慢將 xylene dibromide 加入 acetonitrile 中與化合物 5 反應。攪拌反應 3 小時後有白色固體產生，抽氣過濾可得白色固體，並用乙醚沖洗兩三次，將白色固體溶於 100 ml 二次水中並 reflux 10 小時，接著用氫氧化鈉將水溶液調成 2N 水溶液，繼續 reflux 一天。水解完後用 100 ml 的 chloroform 萃取三次，收集有機層並加硫酸鎂去水，靜置後重力過濾得濾液，並將溶液抽乾得澄清淡橙色油狀物。配置比例為 $\text{HCl} : \text{ethanol} = 1 : 2$ 的混合溶液 120 ml，將油狀物溶於此混合溶液中攪拌 3 小時，會有白色沉澱析出，抽氣過濾後用 ethanol 沖洗固體，經乾燥後得白色粉末約 2 g。

產率：38%

○1, 3-bis(1, 4, 7-triazacyclonon-1-ylmethyl)benzene

NMR(D₂O, 300 MHz) :

¹H : δ 2.90, δ 3.10, δ 3.51(-NCH₂CH₂N-), δ 3.80(-ArCH₂N-), δ 7.32(aromatic hydrogen)

¹³C : δ 42.32, δ 43.78, δ 47.62(-NCH₂CH₂N-), δ 58.78(-ArCH₂N-), δ 129.38, δ 130.24, δ 132.12, δ 135.93(aromatic carbon)

○1, 2-bis(1, 4, 7-triazacyclonon-1-ylmethyl)benzene

NMR(D₂O, 300 MHz) :

¹H : δ 2.90, δ 3.07, δ 3.54(-NCH₂CH₂N-), δ 3.91(-ArCH₂N-), δ 7.32, δ 7.46(aromatic hydrogen)

¹³C : δ 42.88, δ 44.51, δ 48.90(-NCH₂CH₂N-), δ 56.30(-ArCH₂N-), δ 128.77, δ 131.71, δ 135.70(aromatic carbon)

EA : Anal. Calcd for C₂₀H₄₂N₆Cl₆ · 2.5H₂O: N, 13.46; C, 38.47; H, 7.59. Found: N, 13.23; C, 38.60; H, 7.82.

MS(ESI) : M/Z 361.3([M+H⁺])

NMR(D₂O, 500 MHz) :

¹H : δ 2.92, δ 3.10, δ 3.59(-NCH₂CH₂N-), δ 3.95(-ArCH₂N-), δ 7.36, δ 7.50(aromatic hydrogen)

¹³C : δ 42.78, δ 44.43, δ 48.85(-NCH₂CH₂N-), δ 56.13(-ArCH₂N-), δ 128.58, δ 131.49, δ 135.59(aromatic carbon)

14、1, 2 or 1, 3-bis[4, 7-bis(carboxymethyl)-1, 4,7-triazacyclon-1-ylmethyl]benzene

將 0.00346 mol 約 2g 的化合物 13 及 6 當量的 bormoacetate 一起溶於 30 ml 的二次水中，用 6N 的氫氧化鈉水溶液維持反應溶液的 pH 值於 10.5-11 之間，並在 70°C 的油浴下反應三天。反應完後用 6N HCl 將溶液的 pH 值調到 3 左右，將溶液抽乾後可得到橙色固體，用 50 ml 甲醇將固體沖洗溶解，抽氣過濾得橙色濾

液，並將溶液抽乾可得橙色固體，將橙色固體溶於少量二次水後，利用陽離子交換樹脂純化，最後可得約 1.6g 白色固體。

○ **1, 3-bis[4, 7-bis(carboxymethyl)-1, 4,7-triazacyclon-1-ylmethyl]**

benzene

EA: Anal. Calcd for $C_{28}H_{48}N_6O_8Cl_4 \cdot 6H_2O$: N, 9.93; C, 39.72; H, 7.14. Found: N, 9.88; C, 40.03; H, 7.21.

MS(ESI) : M/Z 593.2([M+H⁺])

NMR(D₂O, 500 MHz) :

¹H : δ 3.09, δ 3.47(-NCH₂CH₂N-), δ 3.62(-NCH₂-), δ 4.45(-ArCH₂N-), δ 7.53, δ 7.61, δ 7.66(aromatic hydrogen)

¹³C : δ 46.39, δ 47.69, δ 48.12(-NCH₂CH₂N-), δ 54.02(-NCH₂-), δ 57.51 (-ArCH₂N-), δ 127.95, δ 128.25, δ 130.21, δ 130.93(aromatic carbon), δ 171.00(-COOH)

○ **1, 2-bis[4, 7-bis(carboxymethyl)-1, 4,7-triazacyclon-1-ylmethyl]**

benzene

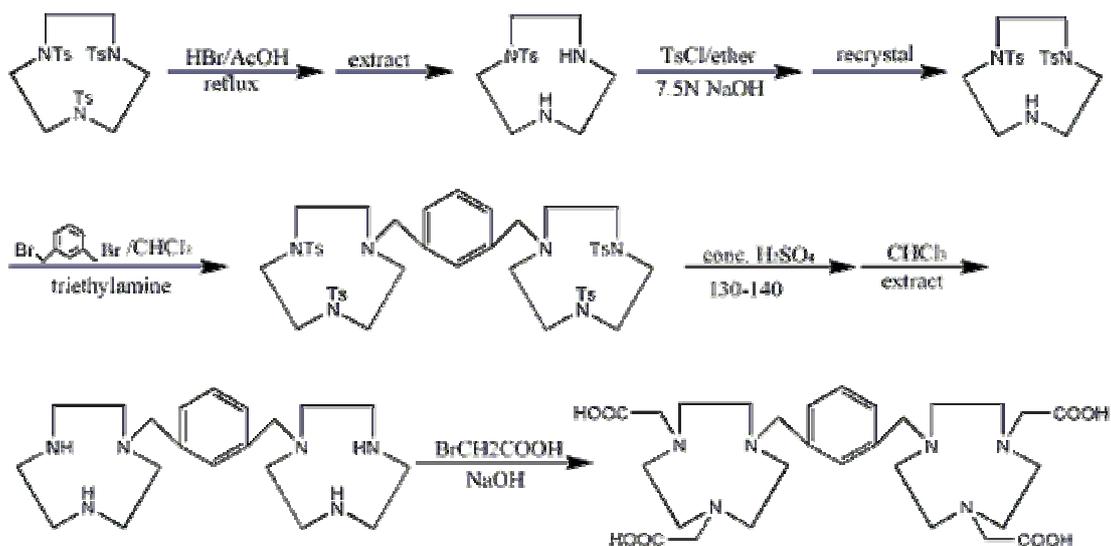
MS(ESI) : M/Z 593.2([M+H⁺])

NMR(D₂O, 500 MHz) :

¹H : δ 3.06, δ 3.36(-NCH₂CH₂N-), δ 3.64(-NCH₂-), δ 4.54(-ArCH₂N-), δ 7.47, δ 7.62(aromatic hydrogen)

¹³C : δ 46.44, δ 47.12, δ 47.60(-NCH₂CH₂N-), δ 53.23(-NCH₂-), δ 54.13(-ArCH₂N-), δ 128.15, δ 128.25, δ 129.58(aromatic carbon), δ 170.00(-COOH)

Scheme. 5



15、1-(p-toluenesulfonyl)-1, 4, 7-triazacyclononane

秤取 0.0507 mol 約 30g 的化合物 3，將之溶於 400 ml 的 HBr / AcOH 溶液中油浴 reflux 36 小時，之後過濾溶液得固體，用乙醚沖洗固體後得白色粉末，再將此白色粉末溶於 100 ml 1N 的氫氧化鈉水溶液中，用 100 ml 的 chloroform 萃取三次，收集有機層並加硫酸鎂去水，靜置後重力過濾得淡橙色濾液，抽乾溶液可得淡黃色固體約 10g。

產率：73%

熔點：90°C

16、1, 4-bis(p-toluenesulfonyl)-1, 4, 7-triazacyclononane

秤取 0.0355 mol 約 10g 的化合物 15，將之懸浮於 10 ml 7.5N 的氫氧化鈉溶液中，秤取 0.0318 mol 約 6.06g 的 p-toluenesulfonyl chloride，稍微少量一點點，避免難纏副產物出現。溶於 100ml 的乙醚中，在室溫下逐滴滴入溶有化合物 15 的氫氧化鈉溶液中攪拌反應，滴完後再攪拌 3 小時，抽氣過濾得白色粉末，用二次水及 ethanol 沖洗白色粉末。之後將白色粉末溶於 100 ml 的 chloroform 中，並用 100 ml 的二次水清洗萃洗兩次，取有機層並加硫酸鎂去水，靜置後重力過濾

得澄清濾液，將溶液抽乾可得白色固體，最後再用 hot ethanol 做再結晶，可得白色針狀固體 10.8 克。

產率：68%

熔點：225°C

EA：Anal. Calcd for $C_{20}H_{27}N_3O_4S_2$: N, 9.60; C, 54.89; H, 6.22. Found: N, 9.44; C, 54.93; H, 6.31.

MS(ESI)：M/Z 438.2([M+H⁺])

NMR(CDCl₃, 500 MHz)：

¹H：δ 2.43(-CH₃), δ 3.18, δ 3.20, δ 3.44(-NCH₂CH₂N-), δ 7.30, δ 7.32, δ 7.65, δ 7.67(aromatic hydrogen)

¹³C：δ 21.49(-CH₃), δ 48.93, δ 53.05, δ 53.89(-NCH₂CH₂N-), δ 127.18, δ 129.79, δ 135.10, δ 143.61(aromatic carbon)

17、1, 3-bis[4, 7-bis(p-toluenesulfonyl)-1, 4,7-triazacyclonon -1-ylmethyl]benzene

秤取 0.0091 mol 約 4g 的化合物 16 及 0.0137 mol 約 1.39g 的 triethylamine，將兩者混合加入 25 ml 的 chloroform，秤取 0.00389 mol 的 m-xylene dibromide，並將之溶於 5 ml 的 chloroform 中，在氮氣系統及室溫下，慢慢將 m-xylene dibromide 滴入溶液中與化合物 16 反應。攪拌兩天後，用 30 ml 的二次水萃取兩次，取有機層並加硫酸鎂去水，靜置後重力過濾得澄清濾液，將濾液抽乾得白色固體，將固體溶於少量二氯甲烷並利用 silica gel 做純化，最後可得白色固體約 2g。

產率：45%

EA：Anal. Calcd for $C_{48}H_{60}N_6O_8S_4Na_{0.5}$: N,8.50; C, 58.30; H, 6.12. Found: N, 8.46; C, 58.20; H, 6.04.

MS(ESI)：M/Z 489.5([M+2H⁺])

18、1, 3-bis(1, 4, 7-triazacyclonon-1-ylmethyl)benzene

秤取 0.0021 mol 約 2g 的化合物 17，並將之溶於 10 ml 的濃硫酸中，於 130-140 °C 油浴下反應一天，之後待溶液冷卻後用乙醚析出白色固體，抽氣過濾取得白色固體後再將之溶於少量二次水中，於 80 °C 下加活性炭脫色(也可加少許碳酸鋇去除多於硫酸)，過濾後可得澄清無色濾液，用 12N 的氫氧化鈉水溶液將溶液的 pH 值調到 13 以上。用 30 ml 的 chloroform 萃取三次，收集有機層，並加硫酸鎂去水，靜置後重力過濾得澄清無色濾液，將溶液抽乾後得淡白黃色油狀物約 0.65g。產率：88%

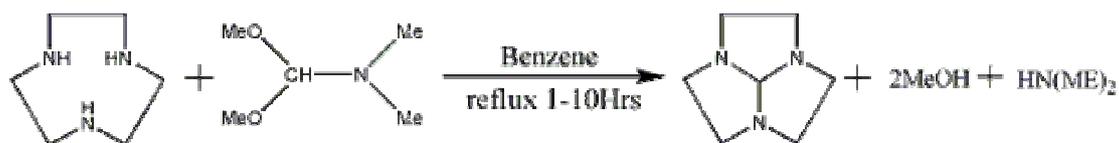
NMR(CDCl₃, 300 MHz) :

¹³C : δ 45.90, δ 46.15, δ 52.15(-NCH₂CH₂N-), δ 61.07(-ArCH₂N-), δ 127.15, δ 127.61, δ 129.06, δ 139.25(aromatic carbon)

2-5 合成方法之比較

本論文的合成部份是以三氮九元環為研究主體，藉由參考前人的文獻資料及本身實驗結果，在此將簡短的敘述不同合成方法的比較。在合成的過程中，首先遇到的難題為接上特定數目取代基的部份，就只接上兩個乙酸根在三氮九元環上而言，不經保護基的途徑，在實驗過程及純化步驟的處理就會顯得相當棘手，甚至可能會有副產物多於主產物的情形發生；相對的，利用保護基的方法則較為方便且實際。接保護基的方法種類很多，本論文主要是以 Ackins 於 1978 年發表的方法為主，如 Scheme.6 所示。

Scheme. 6



此方法的優點有產率高、副產物易處理及經由親核反應後產生的三氮九元環衍生物在有機溶液中易為沉澱粉末的特性，因此在處理上就更為簡便。

除了接保護基的問題外，PhNO₂A 的合成也會遇過另一個有趣的問題，因此才會促使我們使用兩個方法去合成 PhNO₂A。最先合成 PhNO₂A 是用 *tert*-butyl bromoacetate 作為取代基，結果發現 *tert*-butyl bromoacetate 不僅會與兩個二級氮反應，也會與已接上另一取代基的三級氮反應，而且經由實驗證實在大環與酸基比例在一比二的情況下，副產物的產率竟是主產物的兩倍以上；若要避免此情況，則必須降低酸基的比例至一比一左右，在此比例下，副產物就會少到幾乎沒有，但這即會使得產率降到約三成左右。為提升產率，我們使用另一方法去接乙酸根，即用 bromoacetic acid 的方法，不僅步驟變少，且其產率也提高甚多。在進行勁固雙體合成方面也曾遇到瓶頸，最早使用 tosyl group 作為保護基，可惜此法在處理程序上較為繁瑣，不僅影響產率也浪費時間，因此改用藉由 tacn orthoamide 去接橋，此法不僅簡化許多，也會因在接酸前的產物為鹽類固體，使的保存反應物方便許多。



第三章、金屬離子的標定

3-1 金屬陽離子的標定原理

3-1-1 標定原理一

為求得更精確配位子對金屬離子的穩定常數，配位子與金屬離子的濃度精準度就必須更加嚴格地要求。在確定金屬離子濃度方面，一般常用配位子試劑進行標定，例如 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ (Disodium ethylene diaminetetraacetic acid)，此配位子試劑的四個酸基及兩個氮原子具有電子供給團，可以與金屬離子形成穩定的六配位錯合物，當所有金屬陽離子皆與配位子反應後，即達滴定終點，其莫耳比率為 1：1。

標定濃度的實驗，除了配位子試劑及金屬離子外，尚需金屬離子指示劑及緩衝溶液。例如 Eriochrome black T 在 $\text{pH}=10.0$ 伴隨有金屬離子的水溶液中為酒紅色，而當足量的 EDTA 與金屬離子螯合反應後，溶液會由酒紅色轉為藍色，此時即為滴定終點。

一般而言，當我們在標定金屬離子濃度時，較常用的配位子試劑為 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ ，利用 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ 來標定金屬離子時，以下三種方法是較常被使用的：

1. 直接滴定法(Direct Titration Method)：大約有四十種的金屬陽離子可利用 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ 來直接滴定其濃度。
2. 反滴定法(Back Titration Method)：有以下幾種情況較適合此方法；(A)金屬離子與 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ 反應速率遲緩(B) 無適合的金屬離子指示劑 (C) 金屬離子容易產生沉澱。
3. 交換反應滴定法(Exchange Reaction Titration Method)：適用於無適合指示劑可用時。

本論文中所用的金屬離子皆是以 EDTA 直接滴定來標定濃度。

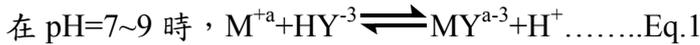
3-1-2 標定原理二

當金屬陽離子與配位子試劑濃度以 1 : 1 的比例混合之後通常會有下列的反應發生



例如：Na₂H₂EDTA(H₂Y)與金屬陽離子在不同的 pH 值中有下列主要的反應平衡，

式中 a 值決定 pH 值大小：



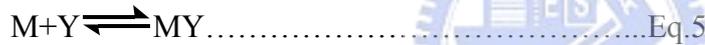
故寫成平衡通式如下：



平衡常數 K 可寫成下式：

$$K = [MY][H]^c / [M][H_c Y] \text{Eq.4}$$

而金屬陽離子與配位子所形成的錯合物之反應平衡式可寫成



其中金屬離子錯合物的穩定常數為 K_{MY}

$$K_{MY} = [MY] / [M][Y] \text{Eq.6}$$

實驗過程中，為避免氫離子對金屬離子指示劑造成干擾，故在標定金屬離子時，

pH 值必須要維持一定的值。例如以 Na₂H₂EDTA 標定 Ca⁺² 時，pH 值要保持在 9-10

左右，其主要反應平衡式如下：



$$K_{MY} = [MY^{a-4}] / [M^{+a}][Y^{-4}] \text{Eq.8}$$

[Y⁻⁴] 值會隨著 pH 值的不同而改變，但在標定過程中，pH 值是維持不變的。而 [Y⁻⁴]

與 C_T 的關係式如下：

$$[Y^{-4}] = \alpha_4 C_T \text{Eq.9}$$

$$C_T = [Y^{-4}] + [HY^{-3}] + [H_2Y^{-2}] + [H_3Y^{-1}] + [H_4Y]$$

$$\alpha_4 = [Y^{-4}] / C_T$$

$$= K_1 K_2 K_3 K_4 / [H^+]^4 + K_1 [H^+]^3 + K_1 K_2 [H^+]^2 + K_1 K_2 K_3 [H^+] + K_1 K_2 K_3 K_4$$

C_T ：未形成錯合物之配位子總濃度

α_4 ： Y^{4-} 在未形成錯合物的配位子之相對濃度

K_i ：配位子的質子解離常數($H_nY \rightleftharpoons H_{n-1}Y + H^+$)

故 $K_{MY} \times \alpha_4 = [MY^{4-a}] / [M^{+a}] C_T = K_{MY} \dots \dots \dots \text{Eq.10}$

K_{MY} 為條件形成常數(Conditional Formation Constant)會隨著 pH 值不同而有所不同。

3-2 金屬陽離子之標定步驟

3-2-1 溶液與藥品的製備

I. 0.1M Ca^{2+} 溶液的配製

將 $CaCO_3$ 放置在 $100^\circ C$ 的烘箱 2-3 小時，烘乾後秤取 1.009 克，小心地滴入 12N $HCl_{(aq)}$ 將 $CaCO_3$ 慢慢溶解，最後再用 100 ml 的定量瓶稀釋成 0.1M 的 Ca^{2+} 溶液。

II. 0.1M Na_2H_2EDTA 溶液的配製

秤取 18.613 克 $Na_2H_2EDTA_{(s)}$ 的粉末，將之溶解後用 100ml 的定量瓶稀釋成約 0.1M 的溶液。

III. 指示劑的配製

(A) 秤取 0.2328 克的 Erichrome black T，用 100ml 的定量瓶將之稀釋成 0.5% 的指示劑溶液。

(B) 秤取 2.84 克的 Murexide，用 100ml 的定量瓶加水稀釋成 1% 的指示劑溶液。

(C) 秤取 Xylenol Orange Tetrasodium Salt，用 100ml 的定量瓶加水稀釋成 1% 的指示劑溶液。

IV. 緩衝溶液的配製

(A) pH=10, NH_3/NH_4^+ 緩衝溶液的製備：準備 30% 的 NH_3 及 NH_4Cl 藥品，利用 Henderson-Hasallbach 方程式計算 NH_3/NH_4Cl 的比例，進而配製 0.1M 的 NH_3/NH_4^+ 緩衝溶液。

(B) pH=5.5, CH_3COONa/CH_3COOH 緩衝溶液的製備：準備冰醋酸及 NaOH 兩藥

品，利用 Henderson-Hasallbach 方程式計算 $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 的比例，進而配製 0.1M 的 $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 緩衝溶液。

V. 金屬陽離子溶液的配製

- (A) Ni^{2+} stock solution 的配製：秤取 1.45 克的 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，用 50ml 量瓶稀釋配製成 0.1M 的藍綠色水溶液。
- (B) Cu^{2+} stock solution 的配製：秤取 1.21 克的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，用 50ml 量瓶稀釋配製成 0.1M 的藍色水溶液。
- (C) Zn^{2+} stock solution 的配製：秤取 1.307 克的 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，用 50ml 量瓶稀釋配製成 0.1M 的無色水溶液。
- (D) Cd^{2+} stock solution 的配製：秤取 1.54 克的 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，用 50ml 量瓶稀釋配製成 0.1M 的無色水溶液。
- (E) Ln^{3+} stock solution 的配製：秤取數毫克 $\text{Ln}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ ，用 100ml 量瓶稀釋配製成 0.02M 的水溶液。大部份的 Ln^{3+} 水溶液為無色，但 Pr^{3+} 為黃綠色， Nd^{3+} 為淡紅色， Er^{3+} 為淡紅色。

3-2-2 標定步驟

1. 將 2-3ml 的 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ 、10ml 的 buffer solution 及一滴指示劑加入混合於 50ml 的燒杯或錐形瓶中。
2. 緩慢將金屬溶液滴入於 EDTA 溶液中，並且同時攪拌之，當將達滴定終點時，每滴間隔調降為 3-5 秒。若指示劑為 Erichrome black T，則溶液一開始為藍色，滴定終點會轉變為粉紅色；若指示劑為 Murexide，則溶液一開始為橘紅色，滴定終點會轉變為藍色。
3. 滴定實驗重複 3-5 次，以求得其平均濃度及其標準差。

Ps. 藉由相同的滴定方法，用標準的 0.1M Ca^{2+} 溶液標定 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ 的濃度。

Ps. 鑰系金屬在高 pH 值的環境下易產生沉澱，故使用 pH=5.5 的緩衝溶液。

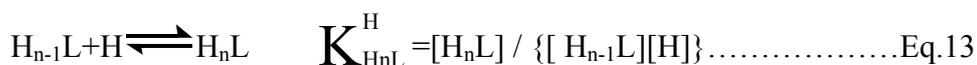
第四章、配位子質子化及其與金屬離子穩定常數之研究

4-1 配位子質子化常數滴定原理

當一中心離子 A 開始與反應物 B 進行反應，一連串的平衡反應就會接著進行，並形成物種 AB_i(i=1,2,3...)。其平衡反應式如下：



假如 A 為配位子(L)，B 為氫離子(H)，則反應平衡為：



而 $K_{H_iL}^H$ (i=1,2,3,...n) 為每一步的質子化常數(Stepwise Protonation Constant)，所

以 $K_{H_nL}^H$ 為總質子化常數(Overall Protonation Constant)，其式子為：

$$K_{H_nL}^H = K_{HL}^H \cdot K_{H_2L}^H \cdots K_{H_nL}^H \dots \dots \dots \text{Eq.14}$$

若平均質子化數為 h，配位子所能解離的氫離子濃度為已知，則平均質子化數可定義為：

$h = (\text{Total dissociate hydrogen ion concentration bound to ligand species}) / (\text{Total ligand concentration})$

$$= \{[HL] + 2[H_2L] + \dots + n[H_nL]\} / \{[L] + [HL] + \dots + [H_nL]\}$$

$$= \left\{ \sum_{i=1}^n i [H_iL] \right\} / \left\{ \sum_{i=0}^n [H_iL] \right\}$$

$$= \sum_{i=1}^n i K_{H_iL}^H [H]^i / \sum_{i=0}^n K_{H_iL}^H [H]^i \quad \text{where } K_{H_0L}^H = 1 \dots \dots \dots \text{Eq.15}$$

溶液中總氫離子濃度 $[H]_t$ 包含未鍵結與鍵結(free and bound)的部份在溶液中的質量平衡式為：

$$[H]_t = \sum i [H_iL] + [H^+] - [OH^-] \dots \dots \dots \text{Eq.16}$$

$\sum i [H_iL]$ ：與配位子鍵結的氫離子濃度(The total bound hydrogen ion concentration)

$[H^+]$ ：可從配位子中解離出的自由氫離子濃度(The total free hydrogen ion concentration)

$[\text{OH}^-]$ ：氫離子濃度的校正因子(The correction term for hydrogen ion concentration formed by the dissociation of water)

在滴定的過程中，由於一直將強鹼持續加入溶液中，所以氫離子的總濃度會下降，此時 $[\text{H}]_t$ 也可以寫成：

$$[\text{H}]_t = \{n[\text{L}]_t - b\} / V \dots \dots \dots \text{Eq.17}$$

n ：配位子質子化總數(Number of protonation sites on the ligand)

$[\text{L}]_t$ ：配位子總濃度(Total ligand concentration)

$[\text{H}]_t$ ：溶液中氫離子總濃度(Total hydrogen ion concentration in the solution)

V ：體積校正因子(A volume concentration factor for dilution)

b ：滴定過程中所加鹼的量

根據(6)，(7)可得：

$$\sum i [\text{H}_i\text{L}] = [\text{H}]_t - [\text{H}^+] + [\text{OH}^-] = (n[\text{L}]_t - b) / V - [\text{H}^+] + [\text{OH}^-] \dots \dots \dots \text{Eq.18}$$

將第(8)式除上配位子總濃度後得到平均質子數 h ：

$$h_{\text{experimental}} = \{[\text{H}]_t - [\text{H}^+] + [\text{OH}^-]\} / [\text{L}]_t \\ = \{(n[\text{L}]_t - b) / V\} - [\text{H}^+] + [\text{OH}^-] / [\text{L}]_t \dots \dots \dots \text{Eq.19}$$

若取 half-integral a (mole of base / mole of ligand) 為 $K_{\text{HnL}}^{\text{H}}$ 值，代入 Eq.15

$$(h_{\text{theoretical}} = \{ \sum_{i=1}^n i [\text{H}_i\text{L}] \} / \{ \sum_{i=0}^n [\text{H}_i\text{L}] \}) \text{ 便可以得到 } h_{\text{theoretical}}$$

，且與實驗值所得到的 $h_{\text{theoretical}}$ 存在一個標準偏差值，利用電腦反覆取點運算後可找出最小偏差，

同時也可找出正確的 $K_{\text{HnL}}^{\text{H}}$ 。

4-2 配位子與金屬離子穩定常數滴定原理

當一金屬離子 M 與一配位子 L 鍵結，其穩定常數的平衡式為：



K_{ML} ：金屬離子錯合物的形成常數

$K_{\text{MHL}}^{\text{H}}$ ：金屬離子錯合物的質子化常數

Log K_{MHL}^H 可利用取 a 值為 0.5, 0.15... 附近幾點加以運算, 若求出其間的標準差小於 0.05 便可作為正確的 Log K_{MHL}^H 。

Log K_{MHL}^H 由上述的方法求得後, K_{ML} 便可利用電荷平衡(Charge Balance)與質量平衡(Mass Balance)求得:

$$[L]_t = [L] + [HL] + \dots + [H_nL] + [MHL] + [ML] = (1 + K_1[H] + K_1K_2[H]^2 + \dots + K_1K_2K_3 \dots$$

$$K_n[H]^n)[L] + [ML](1 + K_{MHL}^H[H]) \dots \dots \dots \text{Eq.21}$$

$$A_1 = (1 + K_1[H] + K_1K_2[H]^2 + \dots + K_1K_2K_3 \dots K_n[H]^n)$$

$$X_1 = (1 + K_{MHL}^H[H])$$

$$[M]_t = [ML] + [MHL] + [M] = [M] + [ML] X_1$$

$$[H]_t = (\{n[L]_t - b\} / V) - [H] + [OH] \dots \dots \dots \text{Eq.18}$$

$$= [HL] + \dots + n[H_nL] + 5[ML] + 4[MHL]$$

$$= [L](K_1[H] + 2K_1K_2[H]^2 + \dots + nK_1K_2K_3 \dots K_n[H]^n) + (5 + 4K_{MHL}^H)[ML]$$

$$= A_2[L] + X_2[ML]$$

$$A_2 = K_1[H] + 2K_1K_2[H]^2 + \dots + nK_1K_2K_3 \dots K_n[H]^n$$

$$X_2 = 5 + 4K_{MHL}^H$$

$[L]_t$ 、 $[M]_t$ 、 A_1 、 X_1 、 A_2 、 X_2 為已知可求得參數, 故 K_{ML} 可被求得

$[M]_t$: 金屬離子總濃度

K_n : 配位子質子化常數(Protonation Constant)

4-3 溶液製備與實驗步驟

4-3-1 藥品與儀器

1, 4-bis(carboxymethyl)-1, 4, 7-triazacyclononane (NO2A)

1-phenethyl-4, 7-bis(carboxymethyl)-1, 4, 7-triazacyclononane (PhNO2A)

1, 3-bis[4, 7-bis(carboxymethyl)-1, 4, 7-triazacyclonon-1-ylmethyl]benzene (MDNO2A)

Ps. 以上藥品合成步驟請參閱第二章

Tetramethylammonium hydroxide 10% $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$

Tetramethylammonium chloride $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$

Potassium hydrogen phthalate KHP

Ps.以上藥品為 Merck 公司 G. R 級試藥

LnCl_3 solution 鑷系金屬離子溶液

Ps.標定方法請參閱第三章

自動滴定儀 (Metrohm Tritrino 702)及恆溫循環水槽

4-3-2 所需溶液與配位子的配製與標定

I. 0.1M $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}_{(\text{aq})}$ 的製備與標定

吸取 10ml $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}_{(\text{aq})}$ 母液，以 100ml 定量瓶將之稀釋成約 0.1M 的鹼液，之後再以一級標準的 $\text{KHP}_{(\text{aq})}$ 標定鹼液的濃度。

II. 0.1M $\text{KHP}_{(\text{aq})}$ 的製備與標定

秤取過量的 $\text{KHP}_{(\text{s})}$ ，放置在烘箱內 2-3 小時，乾燥完後秤取所需的 $\text{KHP}_{(\text{s})}$ ，以 100ml 定量瓶將之配成 0.1M 的 $\text{KHP}_{(\text{aq})}$ 。

III. 0.01M 配位子溶液的配製與標定

秤取所需的配位子，用少許二次水溶解後再以 20ml 定量瓶補足，之後再用已標定過的鹼液來標定配位子溶液的濃度。

IV. 2.0M $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}_{(\text{aq})}$ 的製備

秤取過量的 $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}_{(\text{s})}$ ，放置在烘箱內 2-3 小時，乾燥完後秤取所需的 $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}_{(\text{s})}$ ，以 100ml 定量瓶將之配成 2.0M 的 $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}_{(\text{aq})}$ 。

4-3-3 實驗步驟

I. 配位子的質子化常數

吸取 0.01M 的配位子水溶液 0.5 ml、2.0M $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}_{(\text{aq})}$ 0.25 ml 及二次水稀釋成 5 ml 的滴定溶液($[\text{NO}_2\text{A}]=1\text{mM}$ 、 $\mu=0.1\text{M}$ 的水溶液)，將被滴定溶液加入滴定杯中，並以多孔的杯蓋加以覆蓋，再將滴定杯與循環水槽連接，控制溫度在 $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ，待使整個系統狀態平衡一段時間，而期間用 $\text{pH}=7.0$ 與 $\text{pH}=10.0$ 的

標準溶液校正電極，校正完後再用 pH=4.0 的標準液作測試，使誤差值在 ± 0.05 之內。然後將電極與自動滴定管置入滴定杯內，利用與自動滴定儀相連的電腦設定其滴定參數，其中較重要的設定包括 V step(取點間隔之體積)、equilibrium time(取點間隔之時間)及 signal drift(偵測靈敏度)，設定完後開始進行滴定。實驗完成後將數據輸出，用 Excel 處理數據後，再輸入 PKAS 程式處理即可得質子化常數。

II. 配位子與金屬離子的穩定常數

取標定過的配位子水溶液、2.0M $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}_{(\text{aq})}$ 及金屬離子溶液，配製成 $[\text{NO}_2\text{A}] = 1\text{mM}$ 、 $[\text{Metal}] = 1\text{mM}$ 、及離子強度為 0.1M 的被滴定液 5ml。然後將溶液加入滴定杯中，以多孔的杯蓋加以覆蓋，再將滴定杯與循環水槽連接，並控制溫度在 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ，待使整個系統狀態平衡一段時間，而期間用 pH=7.0 與 pH=10.0 的標準溶液校正電極，而校正完後再用 pH=4.0 的標準液作測試，使誤差值在 ± 0.05 之內，然後將電極與自動滴定管置入滴定杯內，利用與自動滴定儀相連的電腦設定其滴定參數，其中較重要的設定包括 V step(取點間隔體積)、equilibrium time(取點間隔時間)及 signal drift(偵測靈敏度)，設定完後開始滴定。實驗完成後將數據輸出，用 Excel 處理數據後，再輸入 BEST 程式處理即可得穩定常數。

4-4 配位子質子化常數及穩常數討論

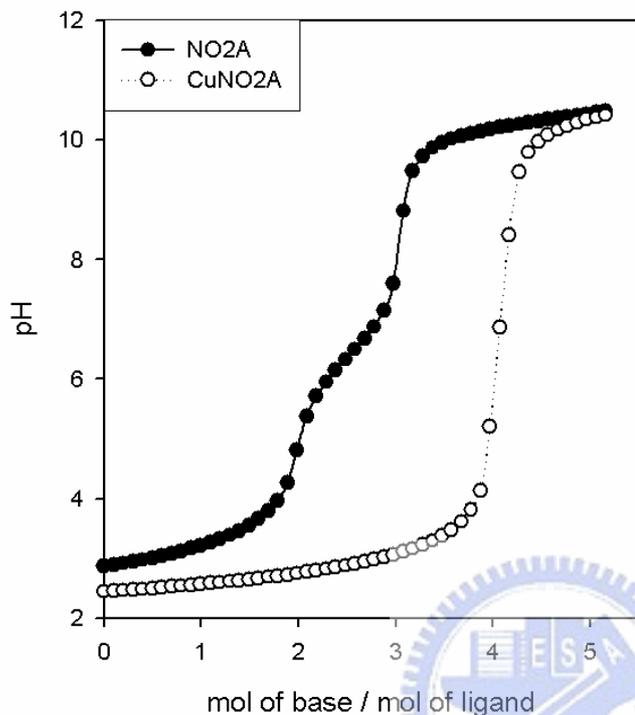
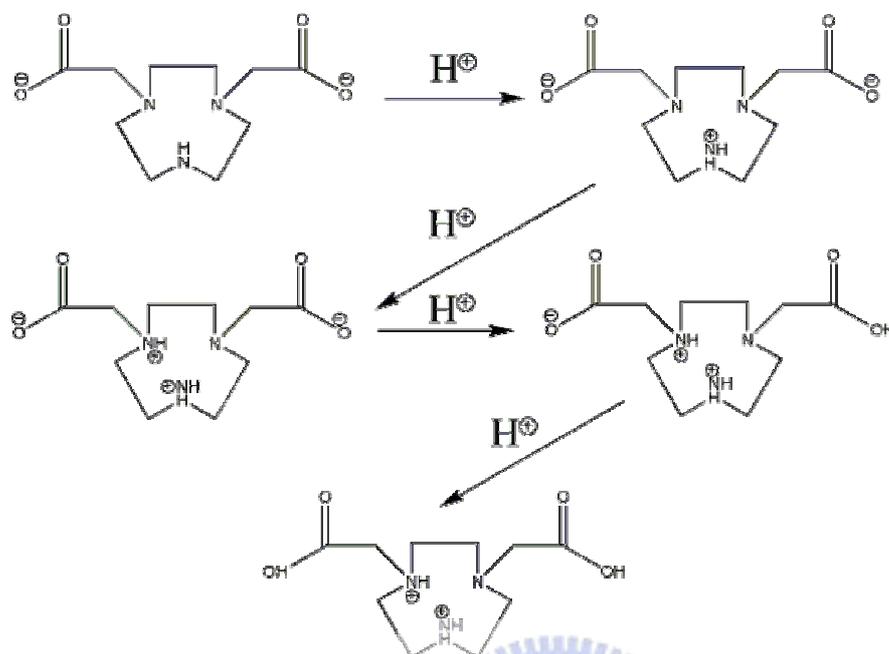


圖 4-4-1. NO₂A 與 CuNO₂A 之滴定圖

由上圖 4-4-1 之 NO₂A 及 CuNO₂A 滴定曲線，可以看到 NO₂A 有兩個反曲點，一個是在 pH=4.8 左右的地方，經過換算後，第一個反曲點剛好與兩個鹼的當量反應，而第二個反曲點是在 pH=8.4 左右的地方，換算後約與三個鹼當量反應。我們已知配位子可與過渡金屬離子 Copper(II) 錯合後，把配位子上的氫離子全部都解離出來，故只會產生一個反曲點，而實驗結果也證實這個反曲點的位置約與四個鹼當量反應，因此更加確定 NO₂A 為帶有兩個 HCl 的配位子(NO₂A·2HCl)，而由這兩個滴定結果的比較，可使我們準確的標定 NO₂A 的濃度。

Scheme.4-1、推測 NO2A 之質子化順序



根據 Dean Sherry 之前 NOTA 的研究顯示⁴¹，推測 NO2A 前兩個質子化的地方為大環上的三級氮，後兩個質子化的位置為乙酸根上，因此推測 NO2A 第一個質子化位置應為二級氮上，再來是三級氮上，最後是兩個乙酸根上。推測第一個質子化位置在二級氮，主要是因為二級氮的鹼度高於三級氮，此外，二級氮不似三級氮還有乙酸根這個立體障礙。

由圖 4-4-1 之 NO2A · 2HCl 的滴定曲線及 Scheme.4-1 為所推測之質子化順序，可發現 NO2A 具有三個緩衝區域，先是兩個乙酸根上的氫離子解離形成第一個緩衝區域(pH=3-5 之間)，之後是三級氮上的氫離子形成另一緩衝區域(pH=5-8 之間)，最後二級氮上的氫離子形成 pH=9-11 之間的緩衝區域。

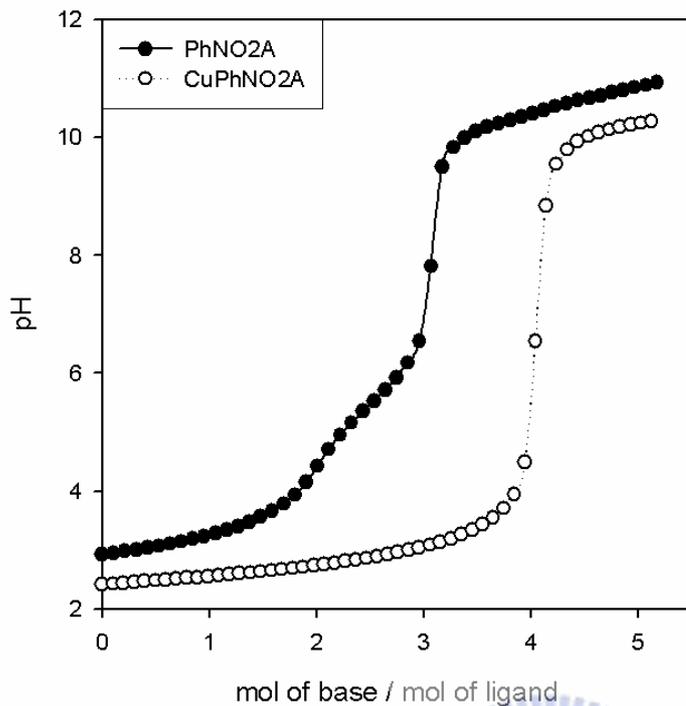


圖 4-4-2. PhNO₂A 與 CuPhNO₂A 之滴定圖

PhNO₂A 為 NO₂A 相似的衍生物，其滴定圖也與 NO₂A 及 CuNO₂A 極為相似，PhNO₂A 的滴定圖也是具有兩個反曲點，第一個反曲點是在 pH=6.5 左右，約為兩個鹼當量的，第二個反曲點約在 pH=9.5 左右，約為三個鹼當量，而 CuPhNO₂A 只有一個反曲點，由滴定圖可以推算 PhNO₂A 與 NO₂A 相似，一樣帶有兩個 HCl。而在質子化順序上，因為 PhNO₂A 不似 NO₂A 有二級氮，而且因分子內氫鍵的影響，推測質子化的順序為前兩個是接有乙酸根的三級氮，後兩個是在乙酸根上。

已知 PhNO₂A · 2HCl 的滴定曲線與 NO₂A · 2HCl 極為相似，綜合滴定曲線與質子化順序的推測，配位子 PhNO₂A 兩個乙酸根上的氫離子先解離形成第一個緩衝區域(pH=3-5 之間)，之後是一個三級氮上的氫離子形成另一緩衝區域(pH=5-7 之間)，最後另一三級氮上的氫離子形成 pH=9-11 之間的緩衝區域。

Scheme.4-2、推測 PhNO2A 之質子化順序

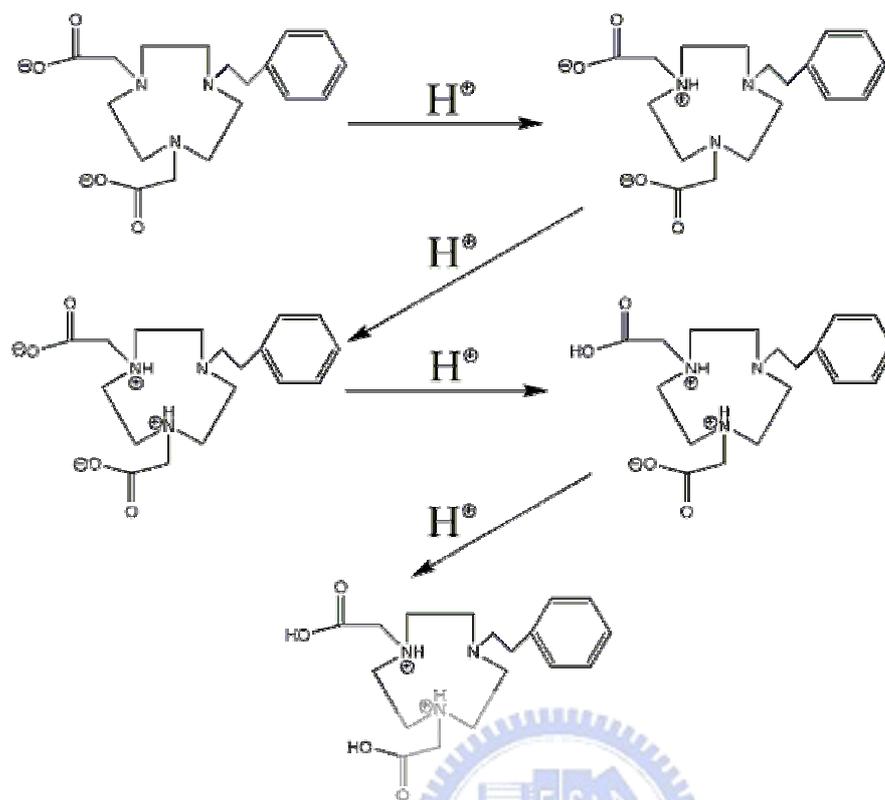


表 4-1、不同配位子之質子化常數

	DOTA ⁴⁷	DO3A ⁴⁷	DO2A ⁴⁷	NOTA ⁴¹	NO2A	PhNO2A	[9]aneN ₃ ⁴⁸
LogK ₁	11.34	10.72	10.94	11.41	10.31	10.52	10.68
LogK ₂	9.90	9.51	9.55	5.6	6.61	5.62	6.86
LogK ₃	4.60	4.40	3.85	2.9	3.36	3.04	2.1
LogK ₄	4.00	3.39	2.55				

由表 4-1 可得知不同配位子的質子化常數比較，不含二級氮的 DOTA 及 NOTA，其 LogK₁ 都大於有二級氮的配位子，尤其是 NO2A 跟 NOTA，兩者足足相差一個數量級，但具有二級氮的 NO2A，其 LogK₂ 卻不似 NOTA 與 PhNO2A 的變化，反而是往上提升一個數量級，若將 NO2A 與 [9]aneN₃ 比較，則兩個的 LogK₂ 是相近的。由以上的關聯性可推測，對於三氮九元環的衍生物而言，二級氮可能會影響 LogK₂ 的提升，但其原因為何卻尚未深入探討。

表 4-2、不同配位子與金屬離子所形成錯合物之穩定常數

LogK _{ML}	NO ₂ A	PhNO ₂ A	NOTA	DO ₂ A ⁴⁸
Ca ²⁺	4.54±0.05	4.15±0.14		7.16±0.10
La ³⁺	8.24±0.05	6.18±0.05	13.5	10.94±0.14
Ce ³⁺	8.91±0.06	6.80±0.10	13.2	11.31±0.03
Pr ³⁺	9.46±0.04	6.93±0.09	13.25	12.00±0.10
Nd ³⁺	9.68±0.02	6.92±0.09	13.15	12.56±0.10
Sm ³⁺	10.17±0.05	7.46±0.04	13.4	12.93±0.01
Eu ³⁺	10.14±0.03	7.61±0.03	13.8	12.99±0.12
Gd ³⁺	10.03±0.10	7.53±0.15	14.2	13.06±0.04
Tb ³⁺	10.11±0.02	7.54±0.11	14.4	12.93±0.01
Dy ³⁺	10.13±0.03	7.65±0.11	15.1	13.13±0.05
Ho ³⁺	10.18±0.02	7.83±0.01	15.15	13.00±0.04
Er ³⁺	10.24±0.07	8.02±0.04	15.2	13.31±0.02
Tm ³⁺	10.54±0.03	8.07±0.005	15.25	13.19±0.11
Yb ³⁺	10.73±0.09	8.26±0.04	15.3	13.26±0.15
Lu ³⁺	10.88±0.002	8.24±0.03	15.8	13.16±0.18
Cu ²⁺	17.41±0.05	16.06±0.14		
Zn ²⁺	16.59±0.01	14.85±0.18		
Ni ²⁺	15.73±0.07	13.55±0.09		
Cd ²⁺	13.18±0.02	11.68±0.10		

Ps. 配位子與過渡金屬的滴定曲線放置在附錄上

鑷系金屬與 NO₂A 及 PhNO₂A 形成錯合物之穩定常數，遵循著鑷系收縮的特性，當金屬離子隨著原子序的增加，其穩定常數也隨之增加，而其他類似的大

環配位子也具有相似的趨勢特性。由上表的比較可得知 $\text{LnNO}_2\text{A}^+ > \text{LnDO}_2\text{A}^+ > \text{LnNO}_2\text{A}^+ > \text{LnPhNO}_2\text{A}^+$ 。LnDO₂A 的穩定常數會大於 LnNO₂A⁺，推測是由於大環配位子環穴大小的影響；而 LnNO₂A 的穩定常數會大於 LnNO₂A⁺，推測是因為大環配位子的配位數影響，NO₂A 有六個配位數，而 NO₂A⁺ 只有五個配位數，比 NO₂A 少了一個乙酸根，故會降低配位子對鐳系金屬的穩定度。LnNO₂A⁺ 穩定常數大於 LnPhNO₂A⁺，NO₂A 與 PhNO₂A 的配位數都是五個，NO₂A 的鹼度總和為 20.28，而 PhNO₂A 的鹼度為 19.18，NO₂A 比 PhNO₂A 還要鹼 1.1 左右，配位子鹼度越高錯合常數就會越高。除此之外，藉由 modeling 也可知曉兩者的環穴並無明顯的差異，故推測是大環上 phenethyl group 立體阻礙的影響，降低了鐳系金屬與大環配位子的穩定常數，綜合以上兩點，使得 NO₂A 與金屬離子的錯合常數，都會比 PhNO₂A 高個 2-3 個級數。

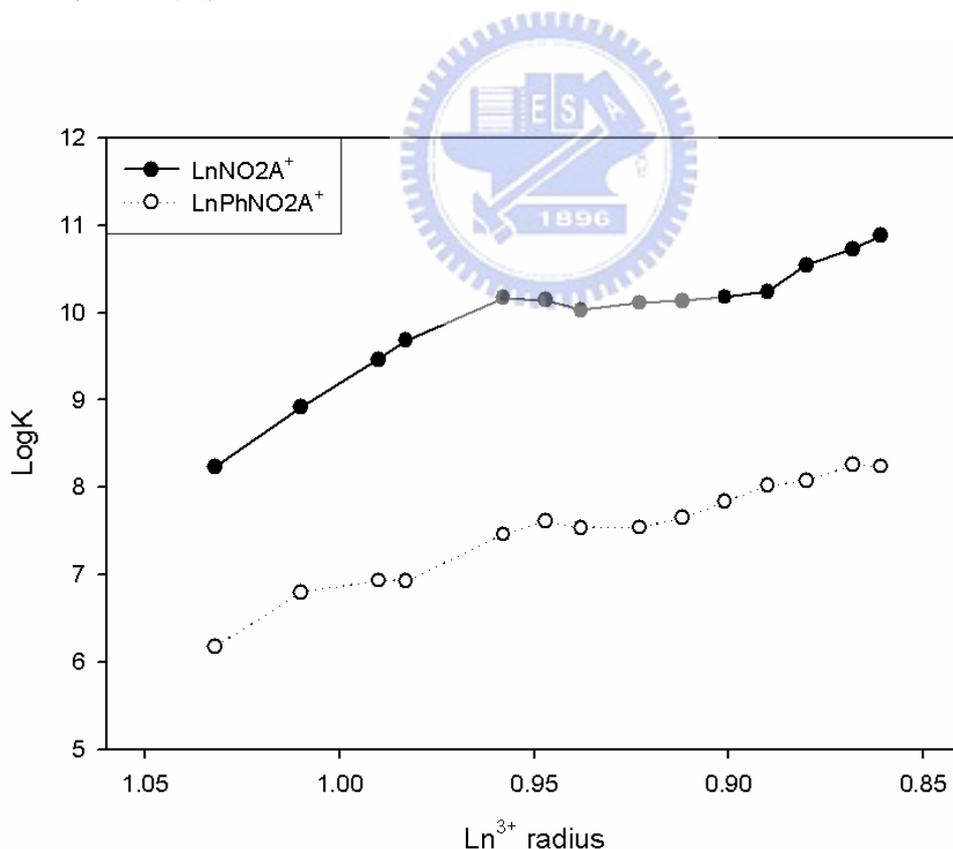
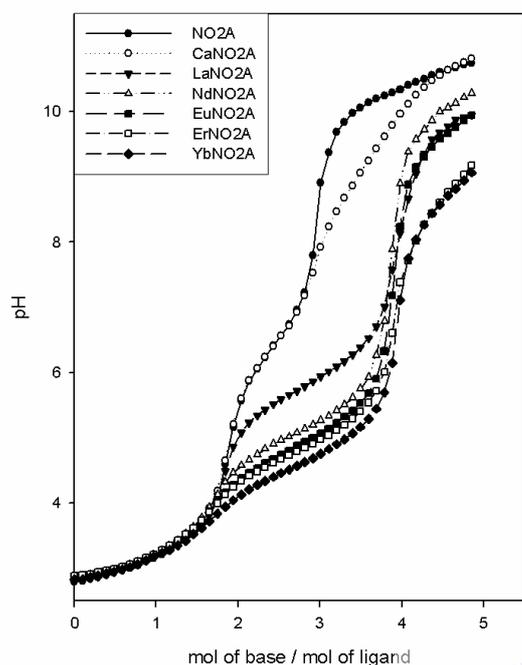


圖 4-4-3. LnNO₂A⁺與 LnPhNO₂A⁺穩定常數隨鐳系金屬離子半徑之變化

The stability of lanthanide complexes



The stability of lanthanide complexes

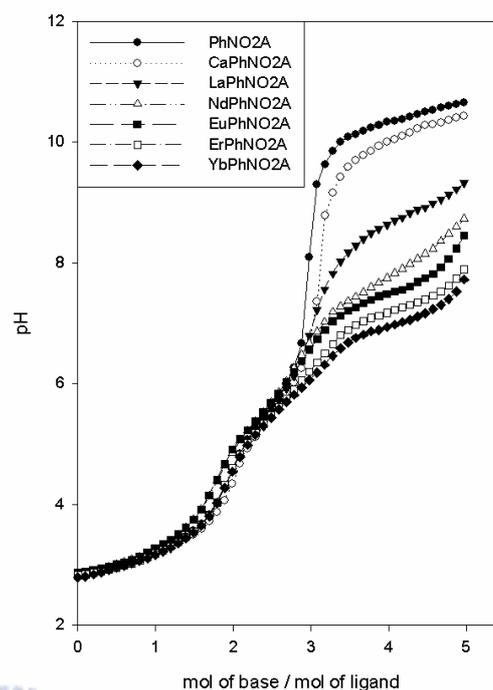
圖 4-4-4. NO₂A 與金屬離子滴定結果 圖 4-4-5. PhNO₂A 與金屬離子滴定結果

圖 4-4-4 與圖 4-4-5 為 LnNO_2A^+ 及 $\text{LnPhNO}_2\text{A}^+$ 的滴定圖，由兩圖相互比較後，可發現 $\text{LnPhNO}_2\text{A}^+$ 不似 LnNO_2A^+ 會在第四個鹼當量有反曲點，而這個現象也讓我們懷疑 PhNO₂A 是否真的有與鑰系金屬進行錯合。

表 4-3. 滴定實驗中 LnNO_2A^+ 在 4.5 鹼當量時 pH 值

LnNO_2A^+	La^{3+}	Ce^{3+}	Pr^{3+}	Nd^{3+}	Sm^{3+}	Eu^{3+}	Gd^{3+}
平均	9.51±	9.08±	9.47±	9.83±	9.40±	9.46	9.37±
	0.05	0.04	0.09	0.02	0.06		0.06
	Tb^{3+}	Dy^{3+}	Ho^{3+}	Er^{3+}	Tm^{3+}	Yb^{3+}	Lu^{3+}
	8.68±	8.64±	8.53±	8.40±	8.54±	8.50±	8.52±
	0.16	0.09	0.07	0.10	0.09	0.09	0.15

上表是 LnNO_2A^+ 的滴定數據，此數值在後面的動力學實驗將會討論到，在此製成表格與其他滴定數據放置在一起。

第五章、金屬離子錯合物之動力學研究

5-1 溶液與藥品的製備

5-1-1 藥品與儀器

1, 4-bis(carboxymethyl)-1, 4, 7-triazacyclononane (NO2A)

Ps.以上藥品合成步驟請參閱第二章

Tetramethylammonium hydroxide 10% (CH₃)₄NOH

Tetramethylammonium chloride (CH₃)₄NCl

Ps.以上藥品為 Merck 公司 G.R 級試藥

LnCl₃ solution 鑷系金屬離子溶液

Ps.標定方法請參閱第三章

UV-Visible(HP 8453)及循環恆溫水槽(實驗溫度控制在 25°C)

5-1-2 所需反應溶液的配製

I. LnNO₂A⁺溶液的製備

將標定過的 LnCl₃ 溶液及 NO₂A 溶液以 1:1.03 比例混合，通常為確保 LnNO₂A⁺ 能完全錯合，會將 ligand 稍微過量 3%左右。接著使用稀釋過後 1%以下的

TMAOH_(aq)調整 LnNO₂A⁺的 pH 值，當溶液 pH 值達到 5.5 以上時，必須更加緩慢小心滴入 TMAOH_(aq)，當 pH 穩定維持在 6.0 左右時，錯合應該已經幾乎完成(可由 LnNO₂A⁺的滴定圖得知)，此時將溶液倒入 20ml 定量瓶中並加水至刻度線。

Ps. LnNO₂A⁺溶液的濃度可按照實驗所需配製，一般而言都是配製 5-10mM。

II. 其他溶液的製備

動力學實驗除了 LnNO₂A⁺溶液外，尚需緩衝溶液、離子強度劑及 BNPP 溶液，以上這三種溶液可直接秤重並調配至所需的濃度即可，不需要再進一步作標定。

Ps. 配製緩衝溶液所用的藥品包含 MES、MPS、TAPS、CHES、CAPS 及 CABS，其 pKa 分別為 6.1、7.2、8.4、9.3、10.4 及 10.7。

III. 動力學溶液的配製

依照實驗所需的濃度、體積來計算各種 stock solution 的用量，再按照計算的量，將錯合物溶液、緩衝溶液及離子強度劑加入定量瓶中混合，之後再加二次水補滿；在此必須注意，計算離子強度時要考慮到錯合物和緩衝溶液所產生的離子強度。

例如：現有 5mM LnNO₂A、200mM buffer、2M (CH₃)₄NCl 溶液，欲配製成 pH=9.0、1mM LnNO₂A、20mM buffer 及 μ= 0.1 的溶液 2mL，其步驟如下：

$$\text{LnNO}_2\text{A 用量： } 2\text{mM} \times 2\text{mL} = 5\text{mM} \times X \quad X = 0.8\text{mL}$$

$$\text{Buffer 用量： } 20\text{mM} \times 2\text{mL} = 200\text{mM} \times Y \quad Y = 0.2\text{mL}$$

利用 Henderson-Hasallbach 方程式計算緩衝溶液產生的離子強度

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log ([\text{A}^-] / [\text{HA}])$$

$$9.0 = 9.3 + \log ([\text{A}^-] / [\text{HA}])$$

$$[\text{A}^-] / [\text{HA}] = 0.501$$

則緩衝溶液產生的離子強度

$$[\text{Buffer}] \times [\text{A}^-] / ([\text{HA}] + [\text{A}^-]) = 0.02\text{M} \times 0.501 / 1.501 = 0.00668\text{M}$$

而 metal complex 產生的離子強度

$$[\text{LnNO}_2\text{A}^+] \times m = 0.001\text{M} \times 5 = 0.005\text{M}$$

$$\text{因此需補足 } \mu = 0.1 - 0.00668 - 0.005 = 0.0881$$

$$0.0881\text{M} \times 2\text{mL} = 2\text{M} \times Z \quad Z = 0.0881 \text{ mL}$$

5-2 動力學之量測

5-2-1 CeNO₂A⁺在不同的 pH 值下，其物種變化與吸收光譜之改變

Ce³⁺在 252nm 及 298nm 會有明顯的吸收峰，當 Ce³⁺與 NO₂A 錯合後，吸收峰的位置會有所偏移改變，且吸收峰會隨著時間而起伏消長，除此之外，在不同 pH 值的環境下，吸收峰的起伏更會有所不同。藉由此實驗可佐證在高 pH 值的環境下會有多種多核物種產生，而且這些多核物種在水解 BNPP 上可能是 active form 或者 inactive form。

5-2-2 反應級數的測定

反應動力學的研究通常在定溫下進行，先配製已知組成的反應混合物，並置於恆溫器中，利用合適的方法測定反應物的濃度減少之時間函數，或生成物濃度增加量的時間函數。藉由這些濃度與時間的數據，可推導出其動力關係式，而且在不同溫度下重複實驗，可得到速率與溫度間的關係式。反應速率通常以單位時間內反應物減少量或生成物增加量來表示，一般以濃度對時間的之變化率來表示之。



$$R = -d[A]/dt = k_n[A]^{m_1}[B]^{m_2} \dots\dots\dots \text{Eq.23}$$

此反應系對反應物 A 而言為 m_1 級(m_1 order)，對反應物 B 而言為 m_2 級(m_2 order)，則此反應之總級數 $n = m_1 + m_2$ 。 m_1 及 m_2 是藉由實驗所決定，與反應物的係數 a 與 b 無關。

初始速率之決定方法(Determination of initial rate method)：

改變某一反應物之初濃度，而其他反應物濃度保持不變，並測定其初期速率的變化(在反應物 5%範圍內的速率變化)，可推定反應物之反應速率級數 m_1 ；同理改變另一反應物之初濃度，而其他反應物濃度保持不變，即可得另一反應物之反應速率級數 m_2 。

5-2-3 假一級反應常數的測定

假設 ML 水解 BNPP 是一個簡單的不可逆反應，一當量 A 物質和一當量 B 物質反應後生成單一產物 P。



如果反應可一步完成，則反應速率和反應物個別的濃度成正比：

$$R = -d[A]/dt = k[A][B] \dots\dots\dots \text{Eq.25}$$

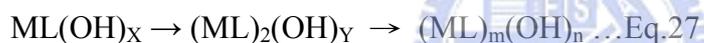
此反應對反應物 A 而言是一級反應，對整個反應而言為二級反應。若我們將 A 的濃度放大使 $[A] \gg [B]$ ，那麼在反應中，A 的濃度改變即可忽略不記，我們可將 $k[A]$ 視為一個常數 k_{obs} ，而速率常數式可改寫為：

$$R = -d[B]/dt = k_{\text{obs}}[B] \dots \text{Eq.26}$$

如此我們可以用一級反應的方式來表示這個反應，對 B 而言即是假一次 (pseudo-first-order) 反應。

5-2-4 LnNO_2A^+ 活性於高 pH 值環境中減弱的實驗

由之前隨著不同 pH 值環境下，偵測 ML 水解 BNPP 的實驗中，我們可發現 ML 的水解活性會隨著時間慢慢降低，因此推測反應中有著物種之間的平衡，甚至 ML 在高 pH 環境下可與 ML 形成 inactive polymer，如 Eq.27 所示，故使得 LnNO_2A^+ 無法如同 EuDO_2A^+ 般可以一直保持著活性。



將未加 BNPP 的反應溶液先調到特定 pH 值，之後選取幾個時間點再添加 BNPP 於反應溶液中，以偵測 BNPP 水解的情況。

5-2-5 長時間監測 LnNO_2A^+ 水解 BNPP 活性實驗

LnNO_2A^+ 的水解活性會隨著反應時間及環境酸鹼值而有所變化，根據之前的實驗已知初始反應速率是隨著 pH 值上升而提升，但亦可由之前實驗得知 LnNO_2A^+ 的活性也會隨著時間而降低，尤其是在高 pH 值的環境中，由此可知高 pH 值環境猶如兩面刃。因此若將監測時間拉長，即可得 LnNO_2A^+ 的一些反應狀況，而可補充一些 LnNO_2A^+ 水解 BNPP 的資料。

第六章、結果與討論

6-1 偵測 CeNO_2A^+ 在不同的 pH 值下其吸收光譜隨時間的改變

配製 $[\text{CeNO}_2\text{A}^+]=1.0\text{mM}$, $[\text{buffer}]=20\text{mM}$ 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visble 監測 285nm 隨時間的吸收值變化，每 200s 為一個循環，總共監測 30000s。在這個實驗完成後，將各個 pH 值的 ML 溶液作全波長掃描，此即可比較出不同 pH 值下特定波長的起伏消長。將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出，用 sigma-plot 繪製吸收值對時間的圖。

The spectra of 1.0mM CeNO_2A^+ at various pH

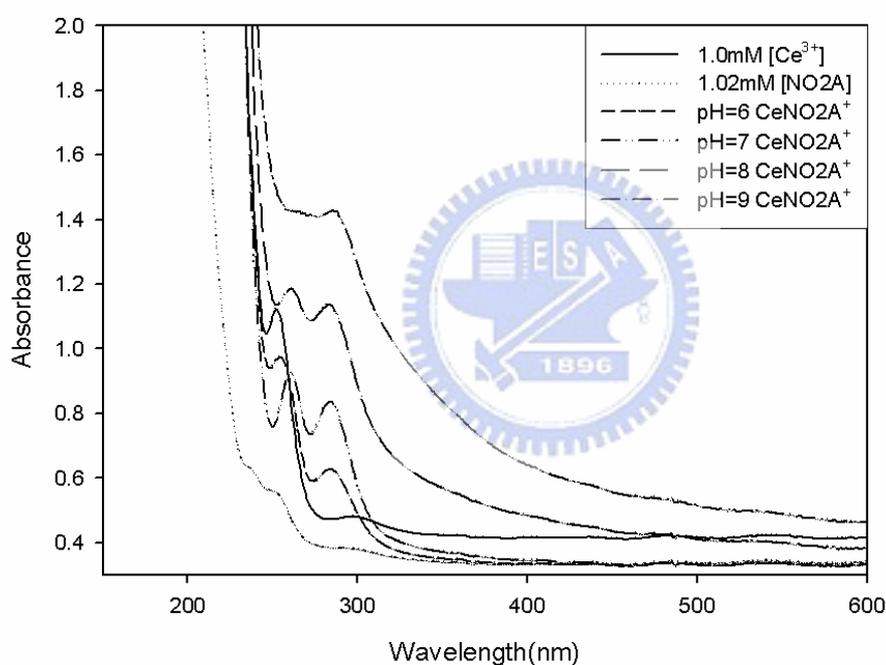


圖 6-1-1. CeNO_2A^+ 在不同 pH 條件下的全光譜圖

圖 6-1-1 為 CeNO_2A^+ 在不同 pH 值環境下反應十個小時後的全光譜圖，此圖由於偵測時間點過晚，導致高 pH 值在 285nm 的數值已經太高而呈現不穩定的狀態。

The absorbances at 285nm vs time for CeNO_2A^+ , 1. mM at various pH

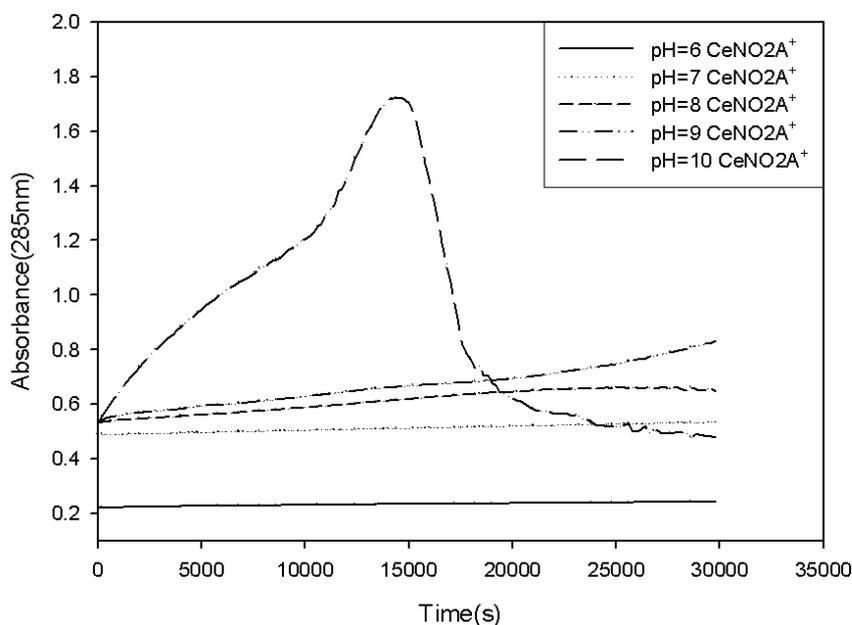


圖 6-1-2. CeNO_2A^+ 在不同 pH 條件下監測 285nm 吸收值隨著時間變化

CeNO_2A^+ 在 pH=6.0 及 pH=7.0 兩個環境下，似乎形成其他金屬錯合物物種的速率非常的緩慢，尤其是 pH=6.0 這組，由全光譜圖可以看到 252nm 的波峰還非常明顯，可能金屬離子尚未完全與 ligand 錯合。而 CeNO_2A^+ 在 pH=8.0 及 9.0 這兩組就有比較明顯的吸收值變化，可見在 pH=8.0 以上 CeNO_2A^+ 形成多核物種的速率就快許多(或許形成多核物種的 gap 就在 pH=8.0 附近)。 CeNO_2A^+ 在 pH=10.0 的環境下雖然形成多核物種的速率很快，但是實驗觀察發現在偵測過程中， CeNO_2A^+ 溶液就有些微白色沉澱物出現，而且吸收光譜在 15000s 後就整個不穩定，不知是否是沉澱物所影響。

6-2 LnNO_2A^+ 水解 BNPP 之研究

6-2-1 YbNO_2A^+ VS BNPP 於 pH=8.5, 9.0, 10.0 的級數分析

一、[BNPP] 改變：配製 $[\text{YbNO}_2\text{A}^+]=1.0\text{mM}$, $\mu=0.1$, [buffer]=20mM, [BNPP]=0.1, 0.2, 0.4, 0.8 及 1.6mM 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visible 監測 400nm 的吸收值變化，每 30s 為一個循環，總共監測 3600s。

將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出，再用 excel 計算 300s 內的斜率，然後再除以 18700 就是反應速率(initial rate)，最後再將反應速率與反應變數取 Log 作圖，所得的斜率就是反應級數，如表 6-1 所示。

表 6-1：YbNO₂A⁺ VS BNPP [BNPP]變

	pH=8.5	pH=9.0	pH=10.0
數據資料	Y=1.017X-5.569	Y=1.009X-5.649	Y=0.886X-5.859
	Y=1.061X-5.427	Y=0.969X-5.734	Y=1.134X-5.121
		Y=0.974X-5.727	Y=0.991X-5.549
級數平均	1.039±0.031	0.984±0.016	1.004±0.088

二、[YbNO₂A⁺]改變：配製[BNPP]=1.0mM, μ=0.1, [buffer]=20mM, [YbNO₂A⁺]=0.1, 0.2, 0.4, 0.8 及 1.6mM 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visble 監測 400nm 的吸收值變化，每 30s 為一個循環，總共監測 3600s。

將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出，再用 excel 計算 300s 內的斜率，然後再除以 18700 就是反應速率(initial rate)，最後再將反應速率與反應變數取 Log 作圖，所得的斜率就是反應級數，如表 6-2 所示。

表 6-2：YbNO₂A⁺ VS BNPP [YbNO₂A⁺]變

	pH=8.5	pH=9.0	pH=10.0
數據資料	Y=0.669X-7.458	Y=0.878X-6.420	Y=0.815X-7.090
	Y=0.693X-7.436	Y=1.004X-6.053	Y=0.763X-7.217
	Y=0.696X-7.392	Y=1.168X-5.441	Y=0.825X-6.997
級數平均	0.686±0.011	1.017±0.103	0.801±0.024

[BNPP]變的級數實驗，由表 6-1 可歸納出不管 pH 值，BNPP 的反應級數都是 1，這與預期的結果是相符合的。而[YbNO₂A⁺]變的級數實驗不同於[BNPP]反應級數，不會受到環境 pH 值影響，YbNO₂A⁺的反應級數是呈現鐘形的趨勢，在 pH=9.0 時達到最高點，數值趨近於 1。故推測在 pH<9.0 時，溶液中包含具

有切割效力物種及不具切割效力物種，例如 $ML(OH_2)_X$ 及 $ML(OH)(OH_2)_Y$ ；而當溶液 pH=9.0 時，物種的平衡趨向於形成具有切割效力的物種，例如 $ML(OH)(OH_2)_Y$ ；但當 pH>9.0 時，溶液中的 metal complexes 會繼續聚合，形成另外一種不具切割效力的 polymer，例如 $(ML)_m(OH)_n$ 。
 $(ML)_m(OH)_n$ 因其不具有配位水，故無法與 BNPP 鍵結而進行 intramolecular attack。
 Ps. 這個實驗條件是在 $ML=0.1-1.6mM$ ， $BNPP=0.1mM$ 的條件下進行，也就是說 $YbNO_2A^+$ 大於或等於 BNPP 濃度下進行實驗。由後面的 pH-dependent 的實驗中，已證實不同 BNPP/ML 的比例，實驗結果就會有所不同，因而之後會再補相關的實驗數據。

6-2-2 $EuNO_2A^+$ VS BNPP 於 pH=8.0, 9.0, 10.0 的級數分析

一、[BNPP]改變：配製 $[EuNO_2A^+]=1.0mM$ ， $\mu=0.1$ ，[buffer]=20mM，[BNPP]=0.1, 0.2, 0.4, 0.8 及 1.6mM 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visble 監測 400nm 的吸收值變化，每 30s 為一個循環，總共監測 3600s。反應完成後，將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出，再用 excel 計算 1000s 內的斜率，然後在除上 18700 就是反應速率(initial rate)，最後再將反應速率與反應變數取 Log 作圖，所得的斜率就是反應級數，如表 6-3 所示。

表 6-3：EuNO₂A⁺ VS BNPP [BNPP]變

	pH=8.0	pH=9.0	pH=10.0
數據資料	Y=0.592X-7.854	Y=0.756X-6.613	Y=0.898X-5.516
	Y=0.724X-7.477	Y=0.817X-6.423	Y=0.889X-5.549
		Y=0.713X-6.742	
		Y=0.833-6.367	
		Y=0.687-6.710	
級數平均	0.658±0.093	0.761±0.032	0.894±0.006

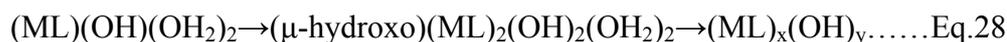
二、[EuNO₂A⁺]改變：配製[BNPP]=1.0mM, μ=0.1, [buffer]=20mM, [YbNO₂A⁺]=0.1, 0.2, 0.4, 0.8 及 1.6mM 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visble 監測 400nm 的吸收值變化，每 30s 為一個循環，總共監測 3600s。反應完成後，將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出，再用 excel 計算 1000s 內的斜率，然後在除上 18700 就是反應速率(initial rate)，最後再將反應速率與反應變數取 Log 作圖，所得的斜率就是反應級數，如表 6-4 所示。

表 6-4：EuNO₂A⁺ VS BNPP [EuNO₂A⁺]變

	pH=9.0	pH=10.0
數據資料	Y=1.454X-4.488	Y=1.563X-3.562
	Y=1.748X-3.603	Y=1.709X-2.601
	Y=1.235X-5.170	
級數平均	1.479±0.182	1.636±0.103

[BNPP]變的級數實驗，由表 6-3 可知 BNPP 級數會隨著 pH 升高而升高，這與推測的級數=1 似乎有所出入，也許是 EuNO₂A⁺催化機制跟其他金屬錯合物有所不同，也可能是實驗操作上對某些細節有所疏忽。此外，經由前述 YbNO₂A⁺ 級數的實驗，已知 BNPP/ML 的比例會對實驗結果有所影響，因此之後會修正實驗的設計，使得實驗更能精確的顯示 BNPP 對於反應速率的影響。

由表 6-4 可得知，EuNO₂A⁺不同於 YbNO₂A⁺的反應機制，EuNO₂A⁺的反應級數是大於一，推測 EuNO₂A⁺會在溶液內形成更具反應活性的物種，且隨著 pH 值升高，形成活性物種的速率及比例會更快更高，如 Eq.28 所示。



dimer 在此推測為更具活性的物種，而(ML)_x(OH)_y推測為不具活性的物種

6-2-3 YbNO₂A⁺ VS BNPP pH-dependent

一、[YbNO₂A⁺] \gg [BNPP]：配製[YbNO₂A⁺]=1.0mM, [BNPP]=0.1mM, μ=0.1,

[buffer]=20mM 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visble 監測 400nm 的吸收值變化，每 100s 為一個循環，總共監測 10000s。之後將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出(格式 CSV)，並用 excel 計算 1000s 內的斜率，然後再除上 18700 即為其反應速率，最後藉由觀察速率對 pH 的趨勢圖推斷出配位水的 pKa。

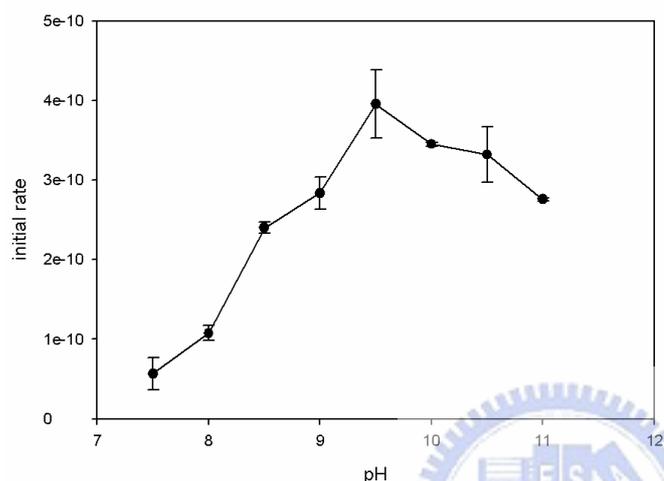


圖 6-2-1. $[YbNO_2A^+] \gg [BNPP]$ 之 initial rate vs pH

在不同 pH 值下， $YbNO_2A^+$ 濃度遠大於 BNPP，或者相反，利用分光光譜儀偵測 400nm 吸收值隨時間變化，即可得知 $YbNO_2A^+$ 的活性會隨著 pH 值的變化，並進而求出其配位水之 pKa。

由上圖 6-2-1 可得知當 pH 大於 8.0 時， $YbNO_2A^+$ 的反應速率會大幅度提升，因此推測溶液內金屬錯合物上的水分子會解離形成 hydroxide，而由 initial rate vs pH 的趨勢圖可推測其 pKa 為 8.5 左右，相對於 $YbNO_2A^+$ 的滴定圖所推測的 pKa=8.5 是一樣的。當溶液 pH 大於 9.5 後，整個反應活性就趨於減緩，推測在高 pH 值環境中， $YbNO_2A^+$ 形成 inactive form 的速率及比率會相對地提高，這也可與之前的級數實驗相互應照。

除此之外，當反應加長後，可觀察到在高 pH 值環境下的 $YbNO_2A^+$ ，其活性 decay 的非常快速，2000s 後就有明顯的飽合情況出現，而這現象與 $LnDO_2A^+$ 的特性有很大的不同，值得我們之後再做詳細討論。

Ps.由上述的實驗設計及結果得知，當 ML 遠遠大於 BNPP 時，ML 與 ML 會形成 inactive form 的機率大增，但如果換成 BNPP 遠遠大於 ML 時，則反應趨勢是否還是如上圖一樣呈現鐘形的趨勢？除此之外，此實驗結果也與我們之前 YbNO_2A^+ 的級數實驗有所對應，都是先隨著 pH 增加而級數提升，然後再 pH=10.0 之後又降下來。

二、 $[\text{BNPP}] \gg [\text{YbNO}_2\text{A}^+]$ ：配製 $[\text{YbNO}_2\text{A}^+] = 0.1\text{mM}$, $[\text{BNPP}] = 2.0\text{mM}$, $\mu = 0.1$, $[\text{buffer}] = 20\text{mM}$ 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visible 監測 400nm 的吸收值變化，每 100s 為一個循環，總共監測 10000s。之後將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出，並且用 excel 計算 1000s 內的斜率，然後再除上 18700 就是其反應速率，最後再藉由觀察速率對 pH 的趨勢圖推斷出配位水的 pKa。

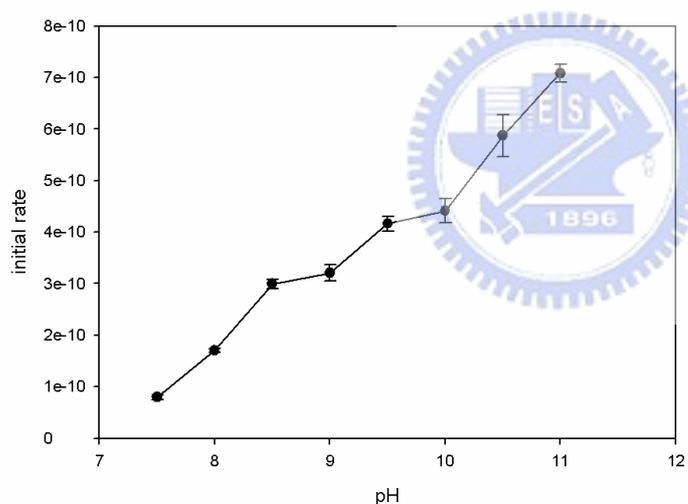


圖 6-2-2. $[\text{BNPP}] \gg [\text{YbNO}_2\text{A}^+]$ 之 initial rate vs pH

由上圖 6-2-2 可得知當反應環境 pH 大於 8.5 時， YbNO_2A^+ 的反應活性提升就比較不明顯，由此可推測配位水的 pKa 約在 8.5 左右，而這結論與另依 pH-dependent 實驗結果相符合。但不同於 $[\text{YbNO}_2\text{A}^+]$ 大於 $[\text{BNPP}]$ 的實驗，當 pH 大於 10.0 時， YbNO_2A^+ 的活性仍持續往上升。推測兩個實驗會有此差異是因當 pH 大於 10.0 時， YbNO_2A^+ 的主要物種是 $\text{M}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})$ ，此物種因為帶有更多的 hydroxides，故水解活性更為提升。除此之外，在高 pH 值環境下，ML 跟 BNPP 會一起競爭 ML，當 BNPP 遠多於 ML 時， YbNO_2A^+ 形成 inactive form 的速率會

被降低，也因為有此現象，這兩個實驗才会有不同的趨勢走向。

回顧之前 YbNO_2A^+ 級數的實驗，定 ML 級數是 $\text{BNPP}/\text{ML} < 1$ ，實驗結果與 $\text{BNPP} < \text{ML}$ 的 pH-dependent 類似，都呈現鐘形的趨勢，所以合理推測在 $\text{BNPP}/\text{ML} > 1$ 的條件下， YbNO_2A^+ 的級數可能就會與圖 6-2 一樣，是隨著 pH 上升而級數往上升。

6-2-4 EuNO_2A^+ VS BNPP pH-dependent

一、 $[\text{EuNO}_2\text{A}^+] \gg [\text{BNPP}]$ ：配製 $[\text{EuNO}_2\text{A}^+] = 1.0\text{mM}$, $[\text{BNPP}] = 0.1\text{mM}$, $\mu = 0.1$, $[\text{buffer}] = 20\text{mM}$ 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visible 監測 400nm 的吸收值變化，每 100s 為一個循環，總共監測 10000s。之後將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出，並用 excel 計算 1000s 內的斜率，然後再除上 18700 即為反應速率，然後再藉由觀察速率對 pH 的趨勢圖以推斷出配位水的 pKa。

Ps. 為求數值精準，低 pH 值那四組因反應速率不會隨時間拉長而 decay，因此計算到 3000s。

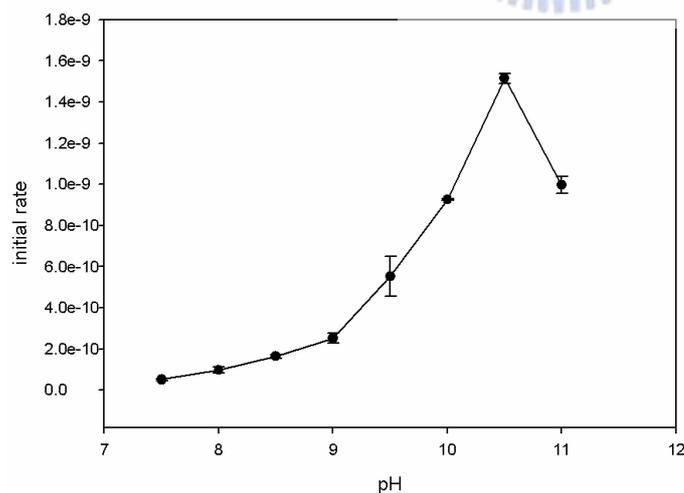


圖 6-2-3. $[\text{EuNO}_2\text{A}^+] \gg [\text{BNPP}]$ 之 initial rate vs pH

在不同 pH 值下， EuNO_2A^+ 濃度遠大於 BNPP，或者相反，利用分光光譜儀偵測 400nm 的波長吸收值隨時間變化，可得知 EuNO_2A^+ 的活性隨著 pH 值的變化並且進而求出其配位水 pKa。

由圖 6-2-3 可知 EuNO_2A^+ 在 pH 大於 9.0 時，其水解 BNPP 的反應速率明顯的提升，推測 EuNO_2A^+ 配位水的 pKa 約在 9.5 左右，這與 EuNO_2A^+ 滴定圖推測的配位水 pKa=9.46 是差不多的。而由之前的級數測定，已知 EuNO_2A^+ 的反應級數為大於 1，推測其在水溶液中會形成 dimer 進行水解反應，而當 pH 值大於 10.5 時，ML 可能會產生第二個 hydroxide，故水溶液中產生的 dimer 可能就會因缺乏配位水與 BNPP 鍵結而失去活性，這可能就是為何 pH=11.0 這組活性反而降低的原因，形成 dimer 方程式如 Eq.29 所示。



由上述的實驗設計及結果，當 ML 遠遠大於 BNPP 時，ML 與 ML 形成 inactive form 的機率會大增，如果換成 BNPP 遠大於 ML 時，則反應趨勢是否還是如上圖一樣會在高 pH 值環境下反而降低反應速率？

二、 $[\text{BNPP}] \gg [\text{EuNO}_2\text{A}^+]$ ：配製 $[\text{EuNO}_2\text{A}^+] = 0.1\text{mM}$, $[\text{BNPP}] = 2.0\text{mM}$, $\mu = 0.1$, $[\text{buffer}] = 20\text{mM}$ 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visible 監測 400nm 的吸收值變化，每 100s 為一個循環，總共監測 10000s。之後將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出，並用 excel 計算 1000s 內的斜率，最後再除上 18700 就是其反應速率，然後在藉由觀察速率對 pH 的趨勢圖推斷出配位水的 pKa。

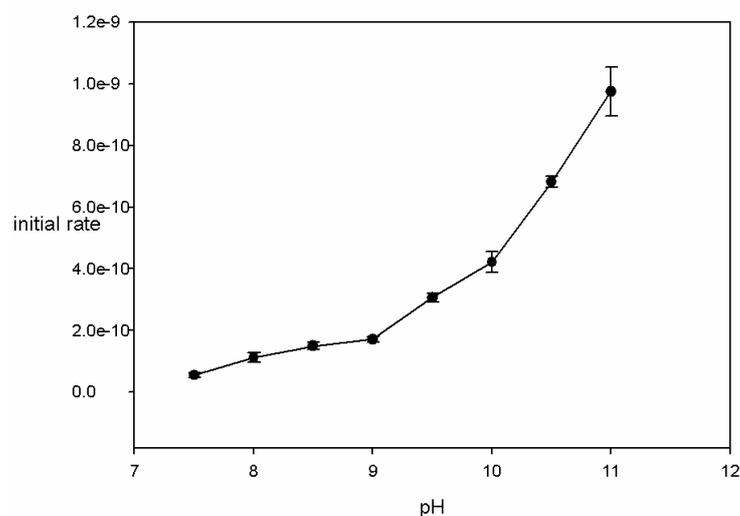


圖 6-2-4. $[\text{BNPP}] \gg [\text{EuNO}_2\text{A}^+]$ 之 initial rate vs pH

由圖 6-2-4 的反應趨勢，可推測得知 EuNO_2A^+ 配位水的 pKa 大概是 9.5 左

右，這個數值不僅與滴定圖相符，也與另一個 pH-dependent 的實驗數值差不多。與另一個 pH-dependent 實驗不同的是在 pH=11.0 這組，會產生這種差異可能是 ML 在高 pH 值環境下會產生 inactive polymer，而在 BNPP 遠大於 ML 的情況下，這個 inactive polymer 的形成就會被抑制，因而提升其水解 BNPP 的速率。

6-2-5 PrNO₂A⁺ VS BNPP pH-dependent

一、[PrNO₂A⁺] \gg [BNPP]：配製[BNPP]=1.0mM, [PrNO₂A⁺]=0.1mM, $\mu=0.1$, [buffer]=20mM 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visble 監測 400nm 的吸收值變化，每 100s 為一個循環，總共監測 10000s。之後將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出，並用 excel 計算 1000s 內的斜率，然後在除上 18700 就是反應速率，最後再藉由觀察速率對 pH 的趨勢圖推斷出配位水的 pKa。

當 PrNO₂A⁺ 在遠多於 BNPP 的條件下，很容易產生沉澱，因此會影響實驗的準確度，於是直接進行 BNPP 遠大於 PrNO₂A⁺ 的實驗。

二、[BNPP] \gg [PrNO₂A⁺]：配製[PrNO₂A⁺]=0.1mM, [BNPP]=2.0mM, $\mu=0.1$, [buffer]=20mM 的反應溶液 2ml。利用 UV-Visble 監測 400nm 的吸收值變化，每 100s 為一個循環，總共監測 10000s。之後將各個檔案中的各個 cell 數據以 CSV 格式輸出，並且用 excel 計算 2000s 內的斜率，然後在除上 18700 就是其反應速率，然後在藉由觀察速率對 pH 的趨勢圖推斷出配位水的 pKa。

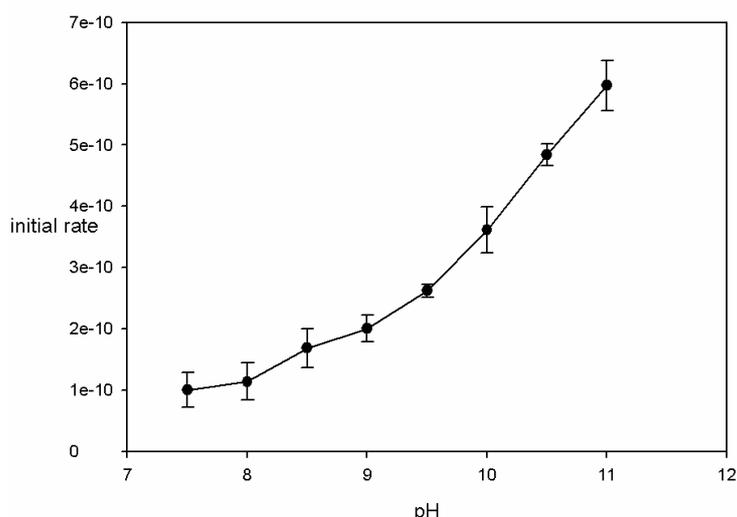


圖 6-2-5. [BNPP]>>[PrNO₂A⁺]-initial rate vs pH

在不同 pH 值下，PrNO₂A⁺ 濃度遠大於 BNPP，或者相反，利用分光光譜儀偵測 400nm 波長吸收值隨時間變化，以得知 EuNO₂A⁺ 的活性會隨著 pH 值的變化並且進而求出其配位水 pK_a。

由反應速率對 pH 值作圖可得知 PrNO₂A⁺ 配位水的 pK_a 約在 9.5-9.6，而與滴定圖推測 PrNO₂A⁺ 配位水的 pK_a 約在 9.4 是非常吻合的。由前述之 ML 大於 BNPP 的實驗，發現 ML 在高 pH 值環境下會快速產生沉澱，雖然當 BNPP 遠大於 ML 時可避免這個情況，但當反應溶液放置久一點後，仍可看到些微的懸浮物產生，為何會有這樣的結果出現，值得我們做更深入的討論。

將以上的實驗數據整理成表：

表 6-5. 鏷系金屬大環水解 BNPP 的初始速率 LnNO₂A⁺ : BNPP=10 : 1

	pH=7.5	pH=8.0	pH=8.5	pH=9.0	pH=9.5	pH=10.0	pH=10.5	pH=11.0
EuNO ₂ A ⁺	5.22e-11	9.81e-11	1.64e-10	2.52e-10	5.53e-10	9.27e-10	1.52e-9	9.97e-10
YbNO ₂ A ⁺	5.67e-11	1.08e-10	2.41e-10	2.84e-10	3.96e-10	3.45e-10	3.32e-10	2.76e-10

表 6-6. 鏷系金屬大環水解 BNPP 的初始速率 LnNO₂A⁺ : BNPP=1 : 20

	pH=7.5	pH=8.0	pH=8.5	pH=9.0	pH=9.5	pH=10.0	pH=10.5	pH=11.0
PrNO ₂ A ⁺	1.00e-10	1.14e-10	1.69e-10	2.00e-10	2.62e-10	3.61e-10	4.84e-10	5.97e-10
EuNO ₂ A ⁺	5.52e-11	1.12e-10	1.50e-10	1.72e-10	3.06e-10	4.22e-10	6.82e-10	9.75e-10

補充資料：LnNO₂A⁺水解 BNPP 實驗

kobs of EuNO₂A and YbNO₂A

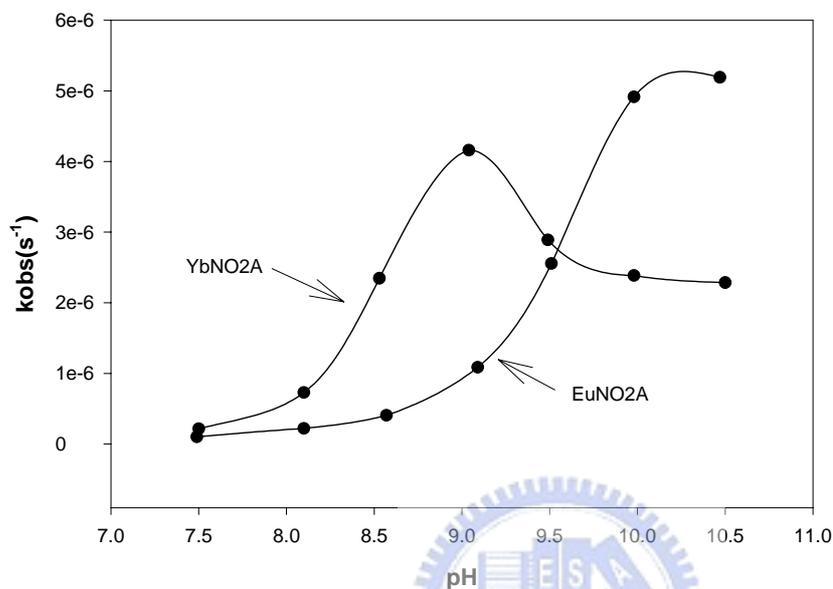


圖 6-2-6. LnNO₂A⁺於不同 pH 條件下水解速率的變化⁴⁹

圖 6-2-5.是俊傑學長所做的資料，雖然兩人處理數據的方法不盡相同，但是仍不會影響到 LnNO₂A⁺其本質。YbNO₂A⁺曲線如同圖 6-2-1 一般呈現鐘形趨勢，而 EuNO₂A⁺曲線同圖 6-2-3，水解速率在 pH=10.5 以後就會開始下降。

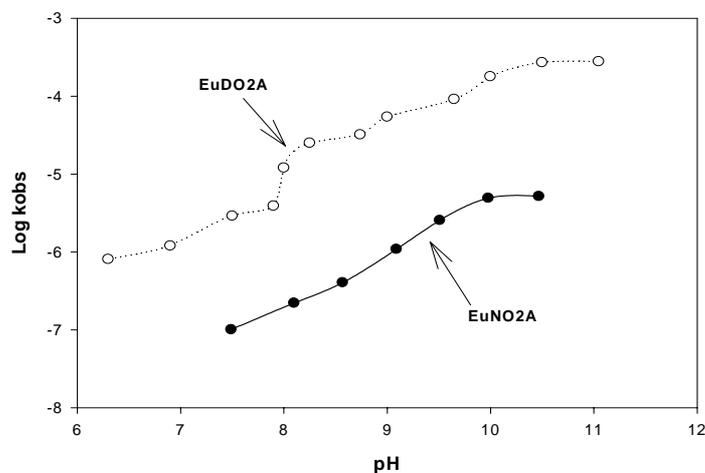


圖 6-2-7. EuDO₂A⁺與 EuNO₂A⁺之水解速率比較⁴⁹

在 EuDO2A^+ 與 EuNO2A^+ 水解 BNPP 的速率比較研究上，因 EuNO2A^+ 比 EuDO2A^+ 多了一個配位水， EuNO2A^+ 水解 BNPP 的能力應該大於 EuDO2A^+ 。由上圖 6-2-6 所示， EuNO2A^+ 水解 BNPP 的速率遠低於 EuDO2A^+ ，這與我們預測不合。由林玉淳學姊的分子模擬資料顯示⁵⁰，DO2A 因為環穴比較大，因此 Eu^{3+} 能深入環穴中心，金屬錯合物上的配位水也因金屬離子深入的原因，使得配位水鍵角及間距較為 EuNO2A^+ 來的小。當金屬錯合物的配位水拉近，則會使得金屬錯合物親核攻擊 BNPP 的速率大為增加。

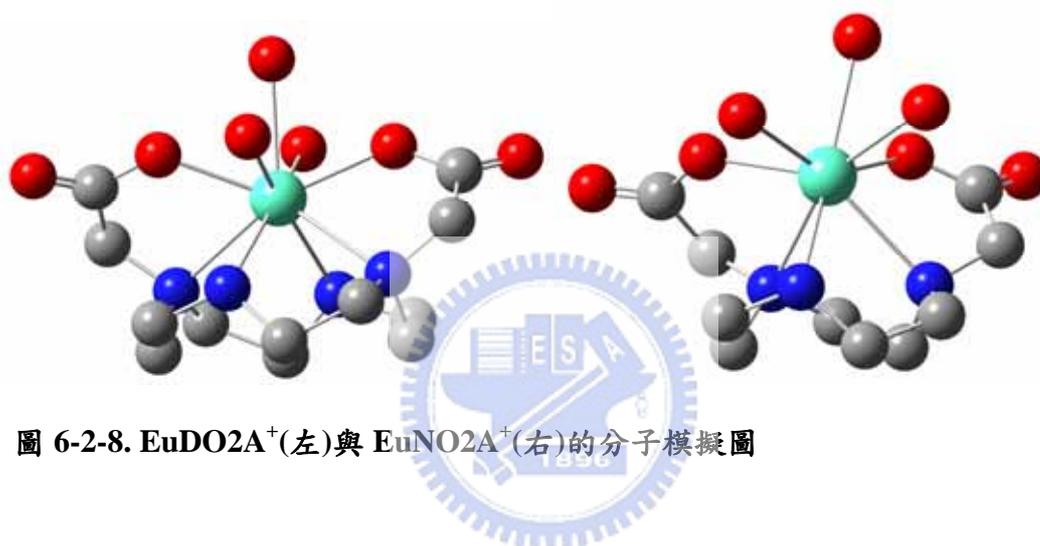


圖 6-2-8. EuDO2A^+ (左)與 EuNO2A^+ (右)的分子模擬圖

表 6-7. EuDO2A^+ 與 EuNO2A^+ 分子模擬數據

Lanthanide complexes	Bond lengths (angstrom)				average (angstrom)
	Bond angles (degree)				
$\text{Eu}(\text{DO2A})(\text{H}_2\text{O})_3^+$					
Eu-N	2.637	2.598	2.637	2.598	2.617
Eu-O (carboxylate)	2.285	2.285			2.285
Eu-O (H_2O)	2.553	2.553			2.553
Eu-O(apical H_2O)	2.500				
O (H_2O)-O(H_2O)	4.699				
O (apical H_2O)-O(H_2O)	2.788	2.788			2.788
O (H_2O)-Eu-O (H_2O)	133.92				
O (apical H_2O)-Eu-O(H_2O)	66.96	66.96			66.96
Eu-O plane					0.93
Eu-N plane					1.58

Eu(NO₂A)(H₂O)₃⁺				
Eu-N	2.536	2.595	2.561	2.564
Eu-O (carboxylate)	2.254	2.236		2.245
Eu-O (H ₂ O)	2.550	2.440	2.454	2.481
O (H ₂ O)-O(H ₂ O)	2.608	3.362	3.173	3.047
O (H ₂ O)-Eu-O (H ₂ O)	62.96	84.37	80.81	
Eu-O plane				0.75
Eu-N plane				1.92

6-2-6 ML 隨預置時間不同，ML 水解 BNPP 的活性測試

選取五個時間點及兩個 pH 值 (0min、10mins、1hr、4hrs、24hrs、pH=11.0 及 pH=9.5)，配製 0.1mM 的 LnNO₂A、2mM 的 BNPP、20mM 的 buffer solution 及 $\mu=0.1$ 的反應溶液 2ml。利用 UV 光譜儀偵測 400nm 的吸收波長變化，偵測時間設定為 3 小時，將其檔案質量 export 出來並用 excel 計算其斜率。斜率為這三小時內的反應速率，製成條狀圖比較不同時間點及不同 pH 的反應速率變化。

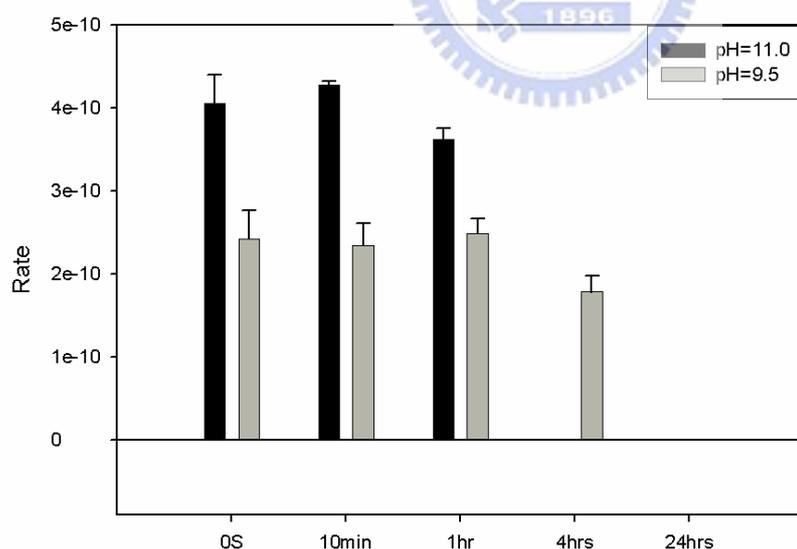


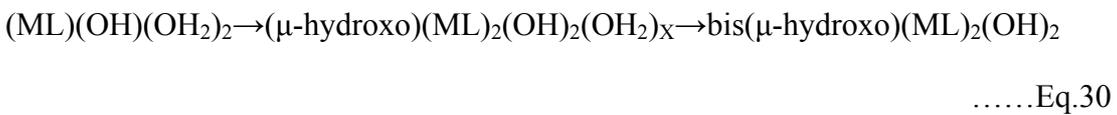
圖 6-2-9. YbNO₂A⁺預置時間對水解 BNPP 反應速率

由之前隨著不同 pH 值環境下偵測 ML 水解 BNPP 的實驗中，我們可發現 ML 的水解活性會隨著時間慢慢降低，因此推測反應溶液內有著物種之間的變化，甚至 ML 在高 pH 環境下可與 ML 形成 inactive polymer，故使得 LnNO₂A⁺

無法如同 EuDO_2A^+ 般可以一直保持著活性。

由上圖 6-2-9 可得知 YbNO_2A^+ 的活性隨著預製時間的加長而降低，尤其是在 $\text{pH}=11.0$ 的環境下，其水解活性在預製四個小時後就完全消失，而相同的情況也會發生在 $\text{pH}=9.5$ 的環境下，只是其活性 decay 的比較慢，四個小時後水解活性約為其它時間點的七成左右，但是在預製一天後其活性就會完全消失。

由之前的實驗推測得知在 $\text{pH}=9.5$ 的時候， YbNO_2A^+ 帶有一個 hydroxide，而 ML 會在溶液內形成 inactive form，因此隨著預置時間加長，水解活性就會漸漸消失。



在 $\text{pH}=11.0$ 的環境下，形成 inactive form 的速率更為快速，由之前的實驗推測此時 ML 帶有一到兩個 hydroxides，因而形成 inactive form 的速率就更加的快速，如 Eq.31 所示。

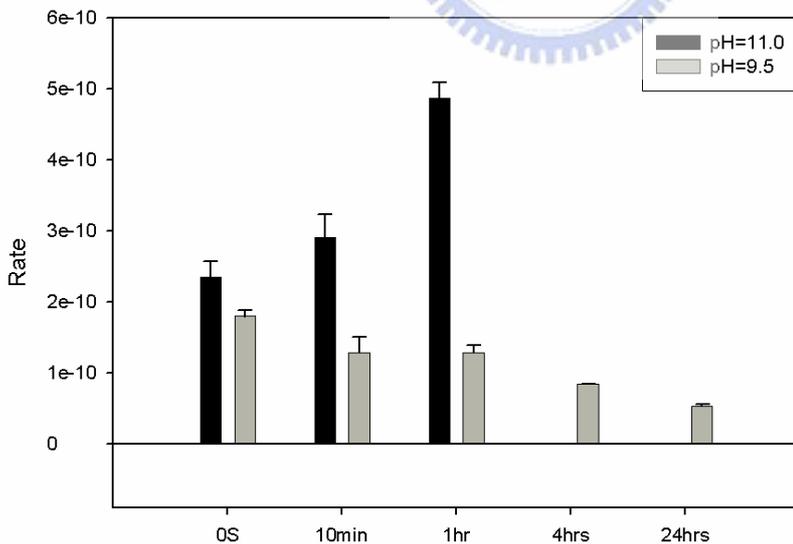
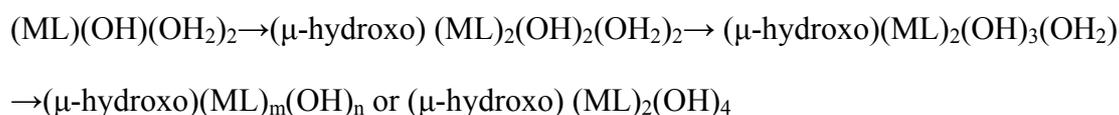


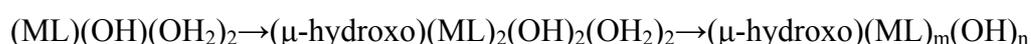
圖 6-2-10. EuNO_2A^+ 預置時間對水解 BNPP 反應速率

在 $\text{pH}=11.0$ 環境下， EuNO_2A^+ 的水解活性會先隨著預製時間而往上提升，推測是因為 EuNO_2A^+ 在高 pH 值環境下會隨著時間產生帶兩個 hydroxides 的物

種，故會先隨著預製時間而先提升，但也因為帶有兩個 hydroxides，使得 EuNO_2A^+ 變成 inactive form 的速率也跟著提升，如同 $\text{pH}=11.0$ 的 YbNO_2A^+ 一樣。



EuNO_2A^+ 在 $\text{pH}=9.5$ 的環境下，其活性隨著時間而慢慢降低，推測是物種隨著時間而產生 inactive polymer，以 monomer 而言，只是此時不似 $\text{pH}=11.0$ 的環境，可以產生帶有兩個 hydroxides 的物種，所以其 inactive form 為 polymer。



6-2-7 長時間監測 LnNO_2A^+ 的水解狀況

選取 $\text{pH}=7.5$ 到 11.0 一共八組的反應環境，配製 0.1mM 的 LnNO_2A^+ 、 2mM 的 BNPP、 20mM 的 buffer solution 及 $\mu=0.1$ 的反應溶液 2ml ，在不同時間點監測其 400nm 的吸收值變化，時間點可較為彈性。選取大概四到五個時間點，將數據製成條狀圖方便做比較。

一、 YbNO_2A^+

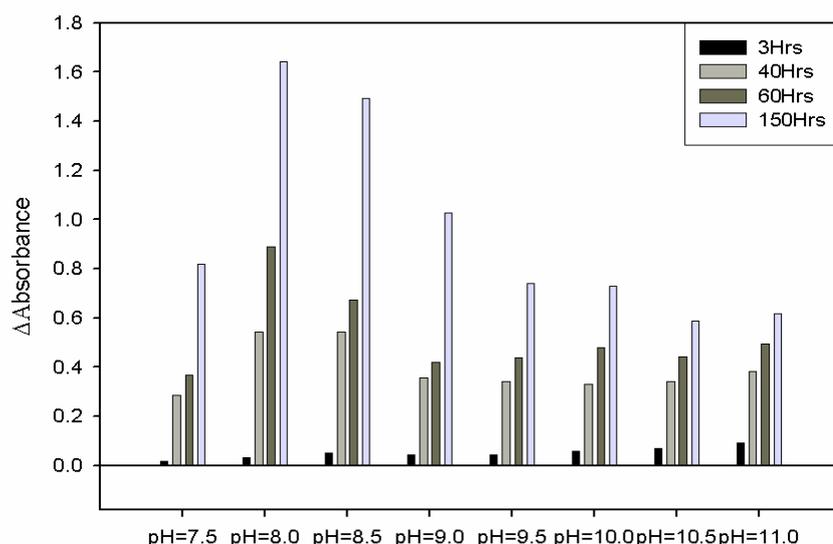


圖 6-2-11. 不同 pH 條件下長時間監測 YbNO_2A^+ 水解 BNPP

由之前的實驗已證實 ML 會與 BNPP 一同競爭 ML，使得 ML 的水解活性會

隨著時間而下降，但之前的實驗大多是不超過 10 個小時的監測，因此並不清楚 ML 在長時間下的失活情況，且其失活情況在不同 pH 值的環境下，一定也會有所不同。

由上圖 6-2-11 可得知 YbNO_2A^+ 短時間的水解速率明顯隨著 pH 上升而提高，當反應時間加長到 40 小時，就可發現低 pH 的反應情況反而比高 pH 的組別來得好，此為高 pH 會形成 inactive dimer 的間接證據。當反應時間至 150 小時，高 pH 的反應幾乎已經停滯了，尤其是 pH=10.5 及 11.0 這兩組。相反的，pH=8.5 以下的水解活性似乎並不受影響，推測在 pH 值低於 8.5 的環境下， YbNO_2A^+ 形成 inactive form 的速率遠遠小於高 pH 環境。

二、 EuNO_2A^+

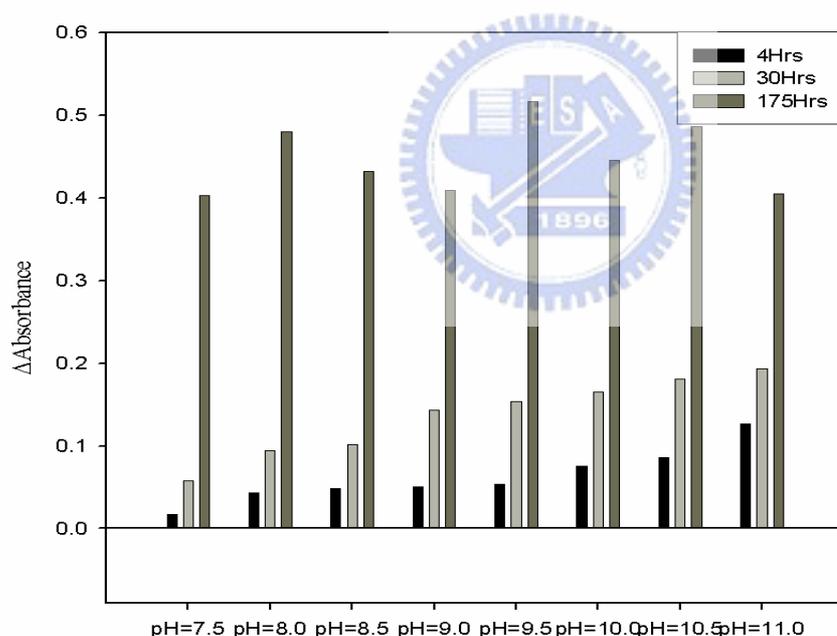


圖 6-2-12. 不同 pH 條件下長時間監測 EuNO_2A^+ 水解 BNPP

當 pH 大於 8.0 後， EuNO_2A^+ 的水解活性會隨著時間而降低，若和 YbNO_2A^+ 的實驗做比較，可發現在低 pH 值環境下 YbNO_2A^+ 不似 EuNO_2A^+ ，較快喪失其水解活性。雖然 EuNO_2A^+ 的初始水解速率普遍比 YbNO_2A^+ 快，但若將時間一加長，則會發現 YbNO_2A^+ 的水解效果明顯的比 EuNO_2A^+ 好，而這項特徵也是未來設計 ligand 所需要注意的。

第七章、結論與未來展望

- 一、 由 $\text{LnPhNO}_2\text{A}^+$ 的實驗數據及滴定圖，我們可得知相較於 NO_2A ， PhNO_2A 較不適合作為人造限制酶，因 $\text{LnPhNO}_2\text{A}^+$ 在高 pH 值環境下會不穩定，易產生沉澱物 (not low kinetic lability)。
- 二、 在設計配位子方面，由前人研究及目前至今的實驗可得知，在設計時應考慮環穴大小及取代基是否有立體障礙等因素，例如 PhNO_2A 與金屬離子的穩定常數比 NO_2A 低了 2-3 個級數。未來我們將藉由配位子錯合物在分子模擬 (molecular modeling) 上的研究，使我們更加了解如何設計適合的配位子，另外，也可藉由分子模擬讓我們更加了解鑷系金屬錯合物特性。
- 三、 在切割動力學方面，經由實驗我們已可求得 YbNO_2A^+ 及 BNPP 的反應級數，這些資料將有助於我們去釐清鑷系金屬錯合物的水解機制；另一方面，雖然在 EuNO_2A^+ vs BNPP 的實驗中，我們尚無法得知與解釋為何其 BNPP 級數 $\neq 1$ ，但在其他實驗中可得知， BNPP/ML 這項實驗條件將會影響實驗結果。未來將會設計更完善的實驗條件，有助於我們去了解鑷系金屬大環錯合物的水解機制。
- 四、 從 pH-dependent 切割動力學實驗得知金屬錯合物的一些特性，如金屬錯合物會隨著 pH 升高而加速金屬錯合物水解效力的失活，由早先的 UV 光譜及雷射光譜研究，可推測得知失活的因素是溶液內產生不具水解效力的多核物種。
- 五、 我們並可從 UV 光譜及雷射光譜研究鑷系金屬錯合物的動力學，在不同 pH 值條件下，可觀察到溶液內金屬錯合物組成會隨著時間改變，但從 UV 光譜及雷射光譜所得的資料仍有限，未來將藉由 NMR 分析 YbNO_2A^+ 使我們能更加了解反應溶液內的物種變化。

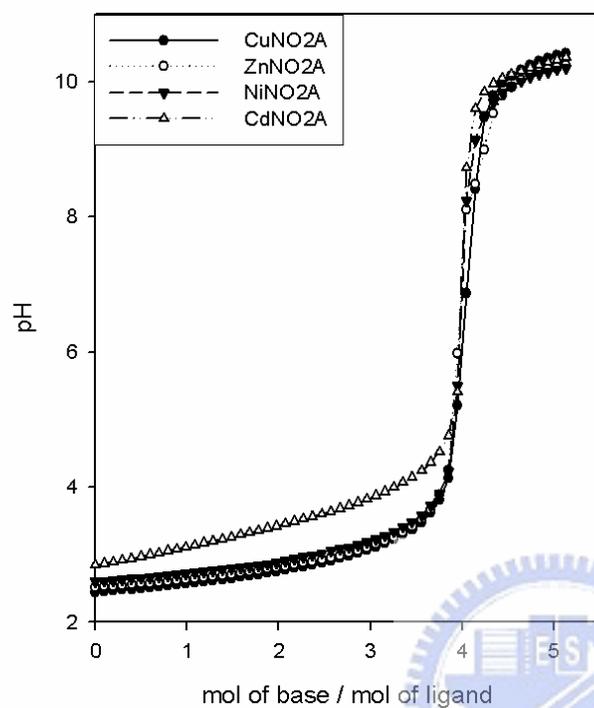
Reference :

1. Hegg, E. L.; Burstyn, J. N., *Coordination Chemistry Reviews* **1998**, 173, 133-165.
2. Thompson, T. G.; Kutateladze, T. G.; Schuster, M. C.; Venegas, F. D.; Messmore, J. M.; Raines, T. G., *Biorg. Chem.* **1995**, 23, 471-487.
3. Oivanen, M.; Kuusela, S.; Lönnberg, H., *Chem. Rev.* **1998**, 98, (961-990).
4. Kuimelis, R. G.; McLaughlin, L. W., *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1027-1044.
5. Häner, R.; Hall, J., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, 7, 423.
6. Komiyama, M., *J. Biochem.* **1995**, 118, 665.
7. Ott, R.; Krämer, R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 52, (761-767).
8. Coleman, J. E., *Annu. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, 21, 441-483.
9. Gellamn, S. H.; Petter, R.; Breslow, R., *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2388-2394.
10. Hendry, P.; Sargeson, A. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 2521-2527.
11. Burstyn, J. N.; Deal, K. A., *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 3585-3586.
12. Deal, K. A.; Burstyn, J. N., *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 2792-2798.
13. Hegg, E. L.; Mortimore, S. H.; Cheung, C. L.; Huyert, J. E.; Powell, D. R.; Burstyn, J. N., *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 2961-2968.
14. Deck, K. M.; Tseng, T. A.; Burstyn, J. N., *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 669-677.
15. Körári, E.; Krämer, R., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12704-12709.
16. Krämer, R., *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, 182, 243-261.
17. McCue, K. P.; Morrow, J. R., *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 6136-6142.
18. Iranzo, O.; Elmer, T.; Richard, J. P.; Morrow, J. R., *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 7737-3346.
19. Iranzo, O.; Richard, J. P.; Morrow, J. R., *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 1743-1750.
20. Fenton, D. E.; Vigato, P. A., *Chem. Soc. Rev.* **1988**, 17, 69-90.
21. Morrow, J. R.; Buttrey, L. A.; Shelton, V. M.; Berback, K. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1903-1905.
22. Morrow, J. R.; Buttrey, L. A.; Berback, K. A., *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 16-20.
23. Amin, S.; Voss, D. A.; Horrocks, W. D. J.; Morrow, J. R., *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 7466-7467.
24. Takasaki, B. K.; Chin, J., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1121-1122.
25. Komiyama, M.; Shiiba, T.; Kodama, T.; Takeda, N.; Sumaoka, J.; Yashiro, M., *Chem. Lett.* **1994**, 1025-1028.
26. Komiyama, M.; Takeda, N.; Takahashi, Y.; Uchida, H.; Shiiba, T.; Kodama, T.; Yashiro, M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans II* **1995**, 269-274.
27. Komiyama, M.; Shiiba, T.; Takahashi, Y.; Takeda, N.; Matsumara, K.; Kodama, T., *Supramol. Chem.* **1994b**, 4, 31-34.

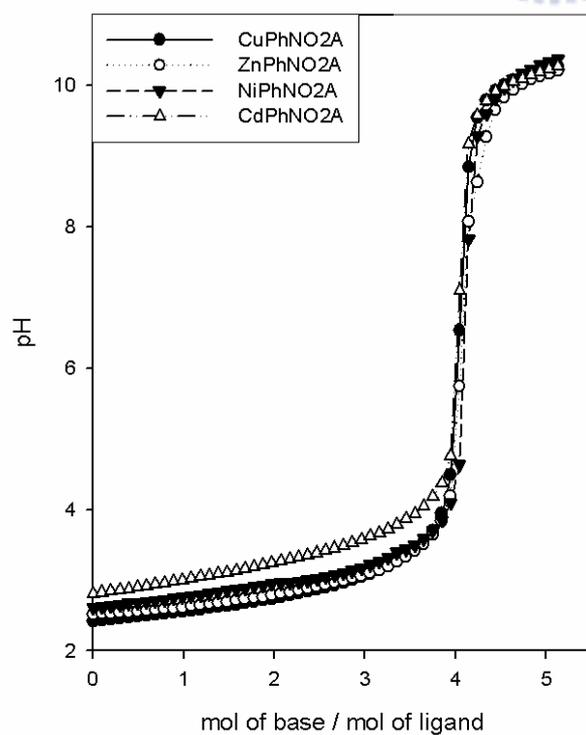
28. Yamamoto, Y.; Tsuboi, W.; Mokoto, K., *Nucleic Acids Research* **2003**, 31, 4497-4502.
29. Kuzuya, A.; Komiyama, M., *Chem. Commun.* **2000**, 2019-2020.
30. Gómez-Tagle, P.; Yatsimirsky, A. K., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 2957-2958.
31. Gómez-Tagle, P.; Yatsimirsky, A. K., *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 3786-3796.
32. Maldonado, A. L.; Yatsimirsky, A. K., *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2859-2867.
33. Chappell, L. L.; Voss, D. A.; Horrocks, W. D. J.; Morrow, J. R., *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 3989-3998.
34. Gunnlaugsson, T.; Davies, R. J. H.; Kruger, P. E.; Jensen, P.; McCabe, T.; Mulready, S.; Ó'Brien, J. E.; Clarke, S., *Stenenson and Ann-marie Fauning Tetra. Lett.* **2005**, 46, 3761-3766.
35. Gunnlaugsson, T.; Harte, A. J., *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1572-1579.
36. Kalesse, M.; Loss, A., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1996**, 6, 2063-2068.
37. Chang, C. A.; Wu, B. H.; Kuan, B. Y., *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 6646-6654.
38. Aian, L.; Sun, Z.; Mertes, M. P.; Mertes, K. B., *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4904-4907.
39. Searle, G. H.; Geue, R. J., *Aust. J. Chem.* **1984**, 57, 959-970.
40. Blake, A. J.; Fallis, I. A.; Parsons, G. S.; Ross, S. A.; Schröder, M., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 4379-4387.
41. Huskens, J.; Sherry, A. D., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4396-4404.
42. Warden, A.; Graham, B.; Hearn, M. T. W.; Hockless, C. R.; Lazarew, G.; Spiccia, L., *organic Letters* **2001**, 3, 2855-2858.
43. Graham, B.; Fallon, G. D.; Hearn, M. T. W.; Hockless, D. C. R.; Lazarew, G.; Spiccia, L., *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 6366-6373.
44. Dischine, D. D.; Delaney, E. J.; Emswiler, J. E.; Gaughan, G. T.; Prasad, J. S.; Srivastava, S. K.; Tweedle, M. F., *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 1265-1269.
45. Fry, F. H.; Graham, B.; Spiccia, L.; Hockless, D. C. R.; Tiekink, E. R. T., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 827-831.
46. Sessler, J. L.; Sibert, J. W.; Lynch, V., *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 4143-4146.
47. C.A. Chang, F.-K. S., Y.-L. Liu, Y.-H. Chen, H.-Y. Chen, and C.-Y. Chen., *J. C. S. Dalton Trans.* **1998**, 3243-3248.
48. Kovacs, Z.; Sherry, A. D., *Synthesis* **1997**, 759-763.
49. 林俊傑, 鑷系金屬與大環多胺 0 多酸基配位錯合物的合成、及其水解磷酸雙酯鍵之效力的研究. 碩士論文 民國 92 年.
50. 林玉淳, 大環配位子結構與質子化位置及鑷系金屬離子錯合物結構之分子模擬. 碩士論文 95 年.

附錄：

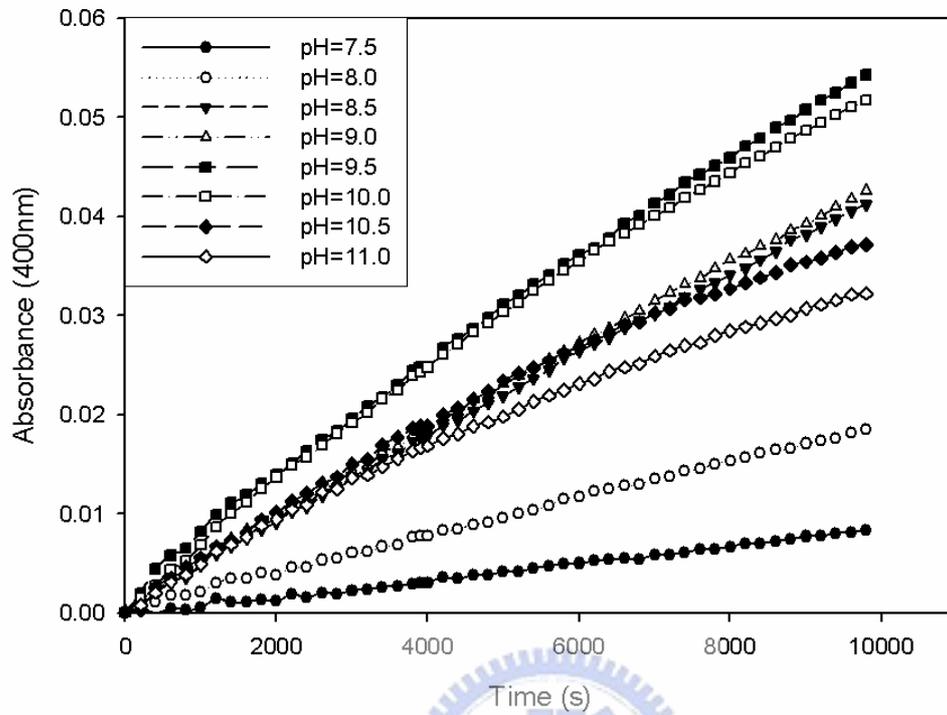
NO₂A 與過渡金屬的滴定曲線



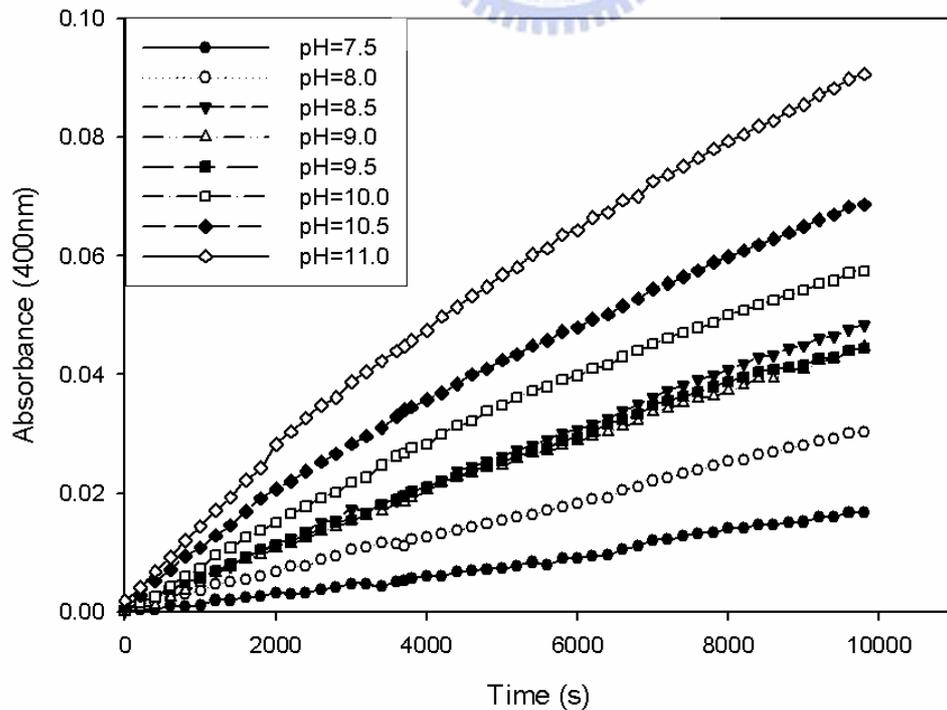
PhNO₂A 與過渡金屬的滴定曲線



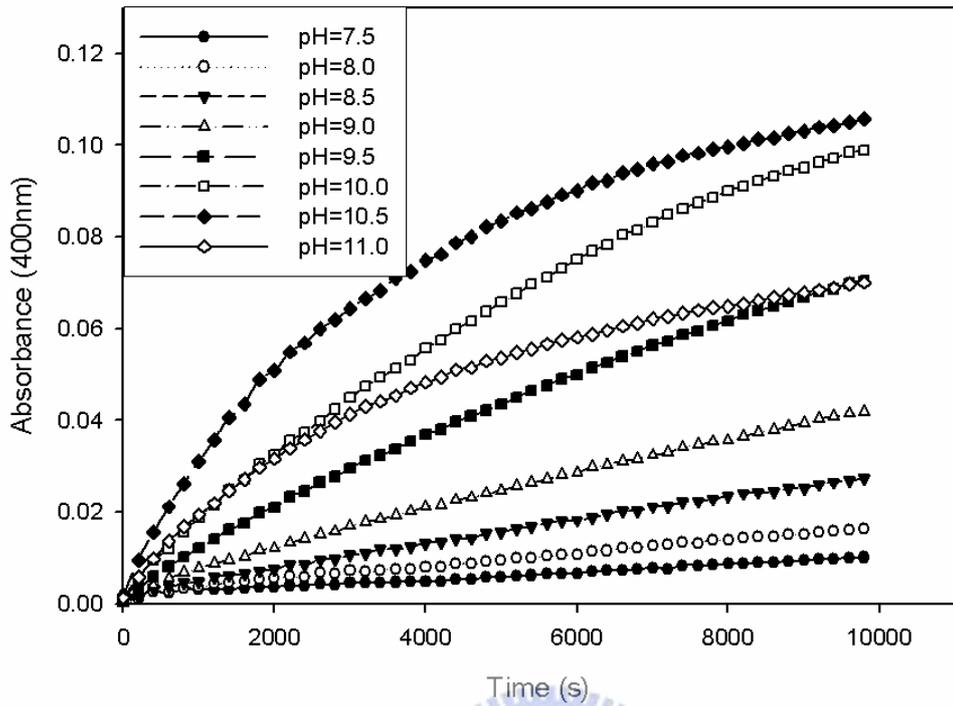
[YbNO₂A⁺] > [BNPP] 利用 UV-Visble 監測 BNPP 水解的情況



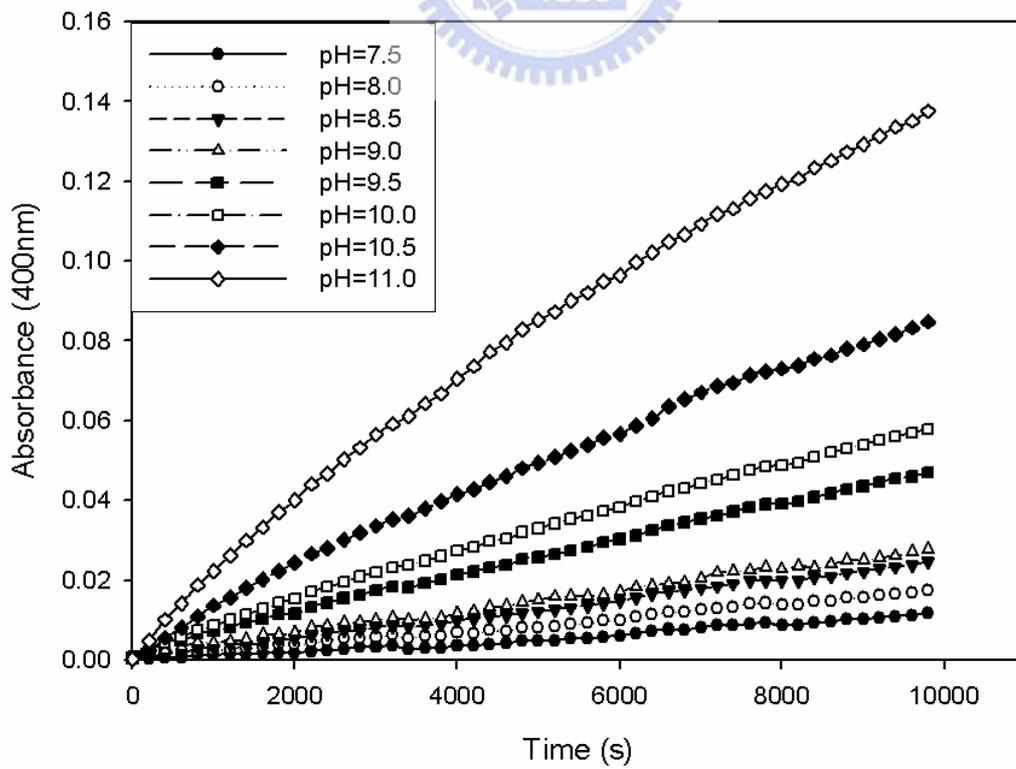
[YbNO₂A⁺] < [BNPP] 利用 UV-Visble 監測 BNPP 水解的情況



[EuNO₂A⁺] > [BNPP] 利用 UV-Visble 監測 BNPP 水解的情況



[EuNO₂A⁺] < [BNPP] 利用 UV-Visible 監測 BNPP 水解的情況



NO2A 的 NMR

Filename: 20051120.hetcor

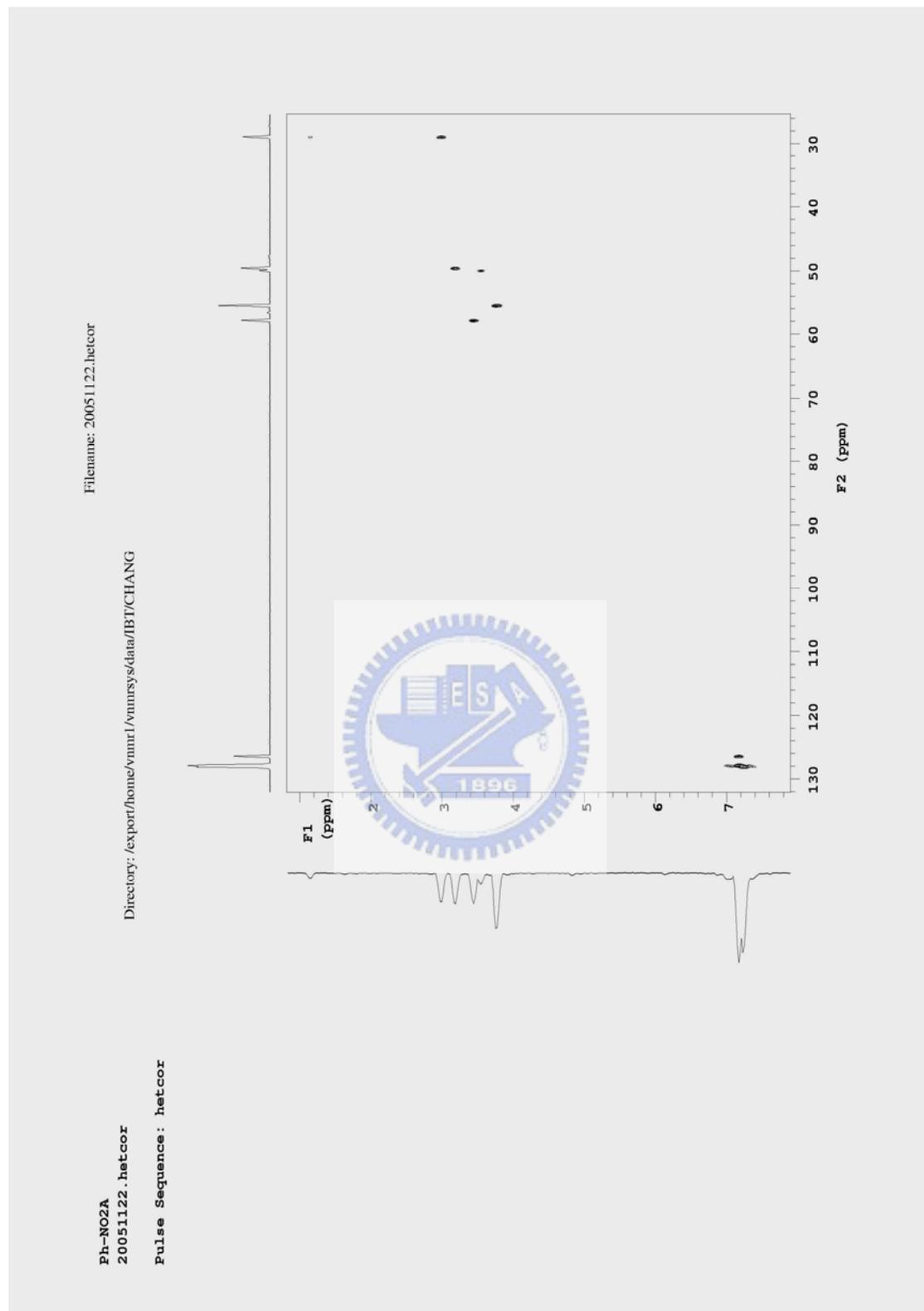
Directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data/IBT/CHANG

1. ON NO2A
20051120.hetcor

Pulse Sequence: hetcor



PhNO₂A 的 NMR



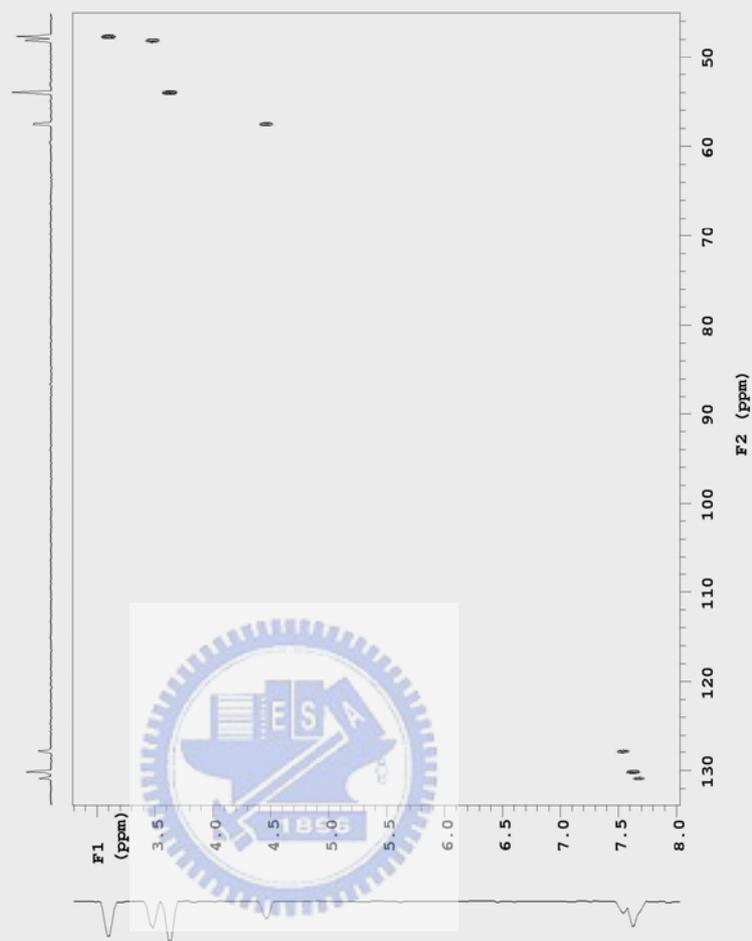
MDNO2A 的 NMR

Filename: 20051206.hetcor

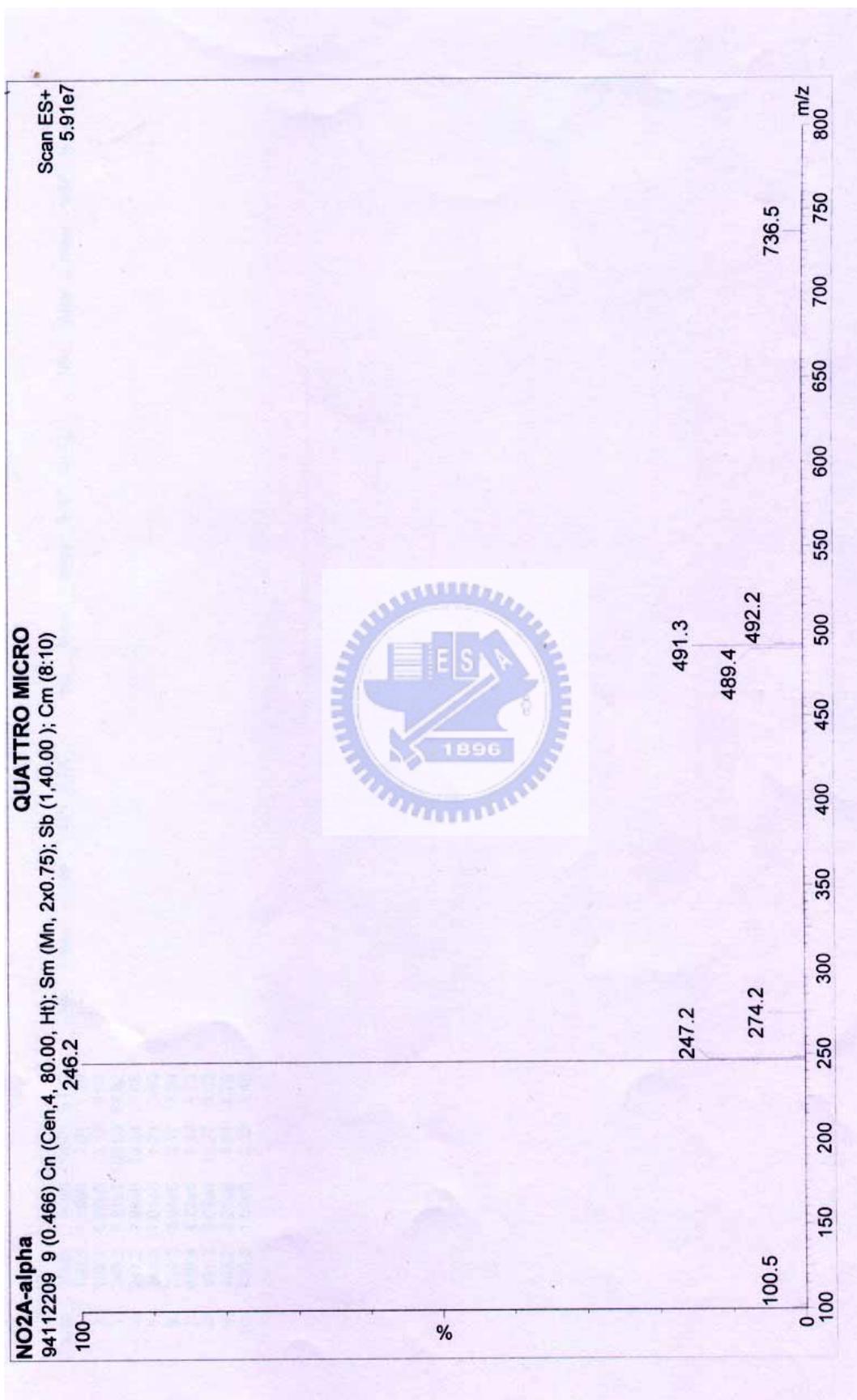
Directory: /export/home/vnmr1/vnmrSYS/data/BJT/CHANG/D20

m-dimer NO2A in D2O
20051206.hetcor

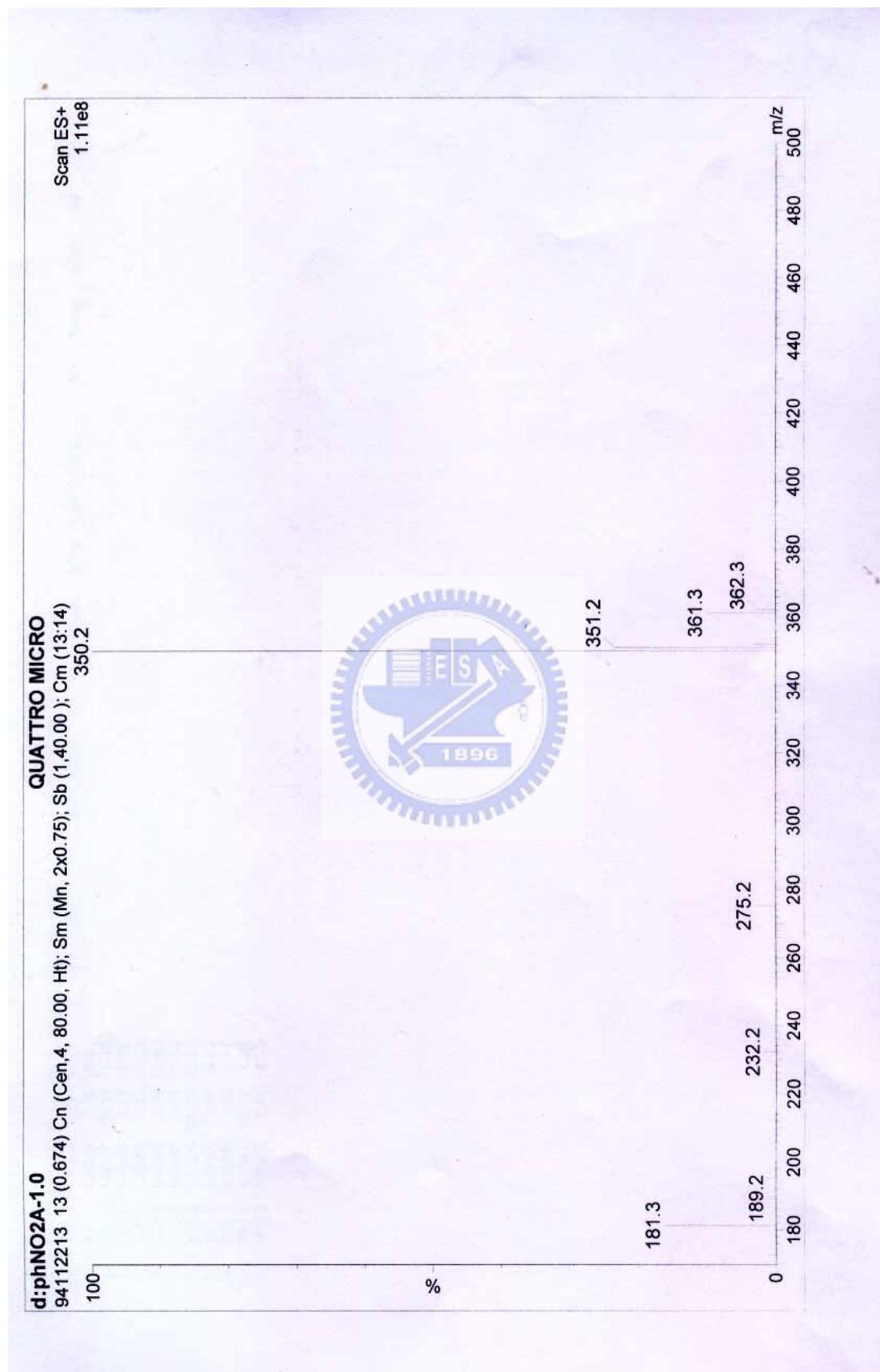
Pulse Sequence: hetcor



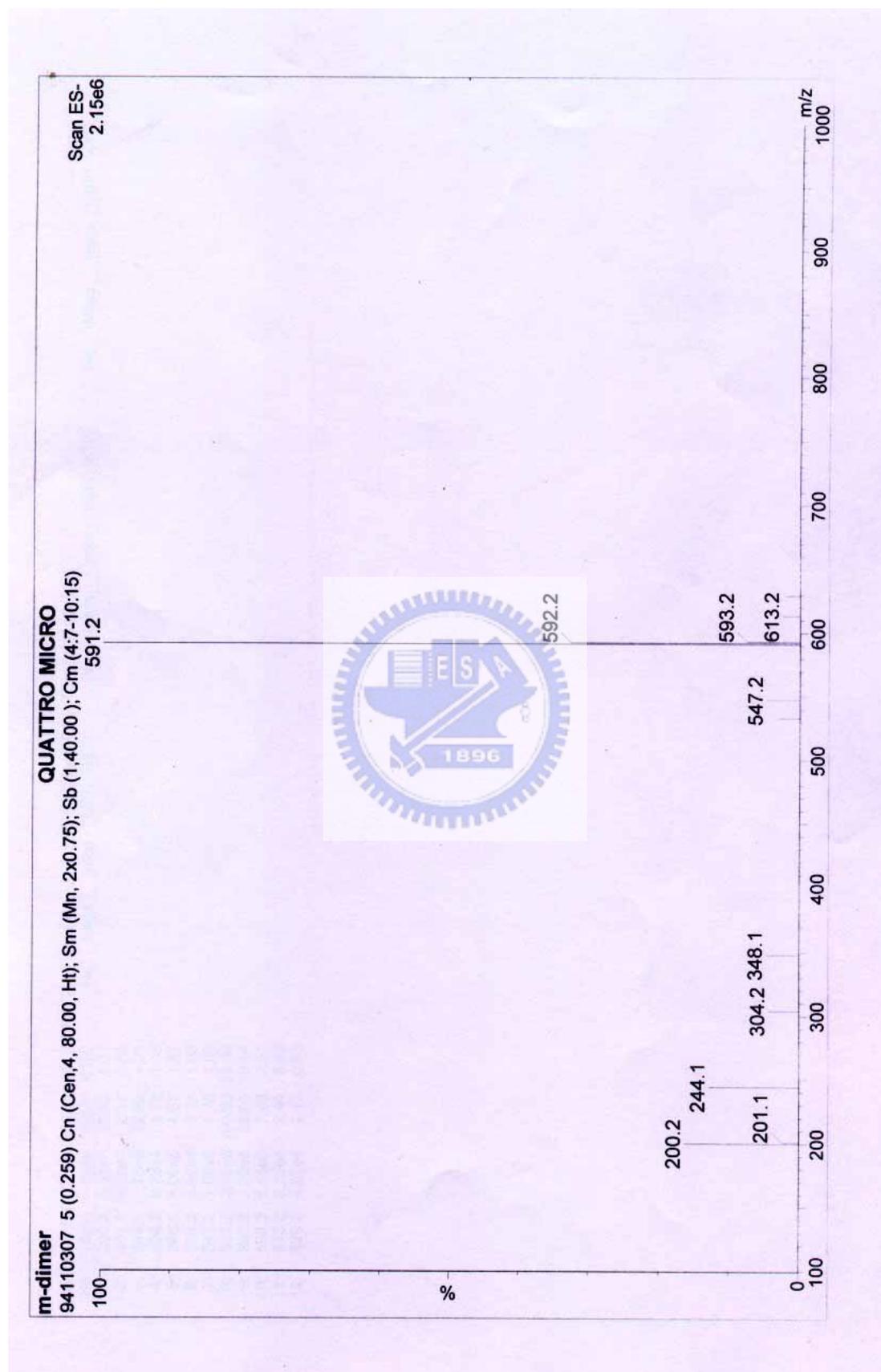
NO2A 的 Mass



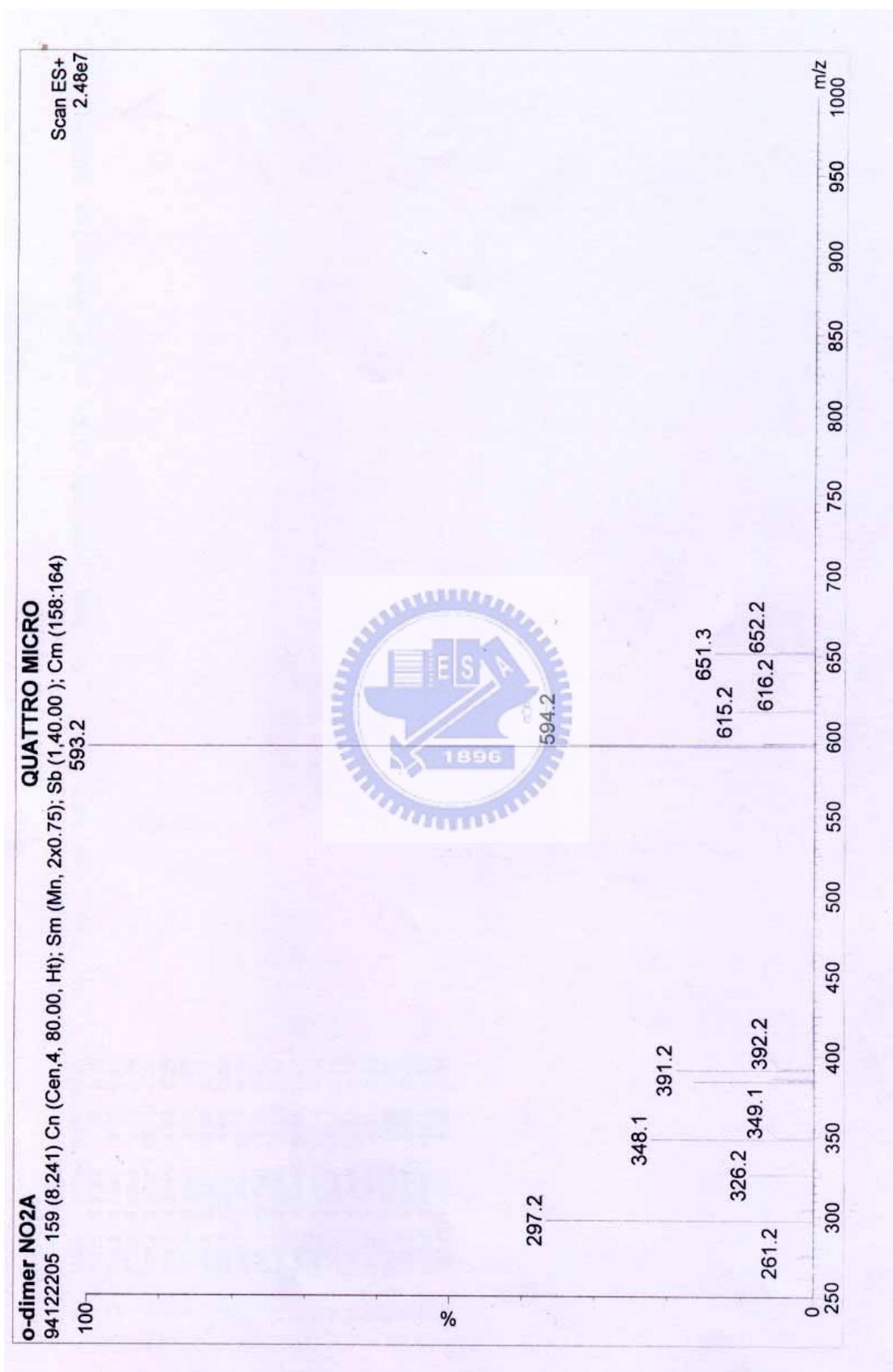
PhNO2A 的 Mass



MDNO2A 的 Mass



ODNO2A 的 Mass



國立交通大學應用化學系

元素分析儀 Heraeus CHN-O Rapid 服務報告書

使用者姓名：蕭志祥	中心編號：941208		
服務單位：交大生科 張正實驗室	樣品名稱或代號：NO ₂ A-α		
收件日期：94 年 11 月 18 日	完成日期：94 年 12 月 06 日		
分析結果：NO ₂ A - 2466			
實驗值：	N%	C%	H%
1.	12.94	37.94	6.61
2.	12.88	37.82	6.70
3.	13.21	37.74	6.65
推測值：	17.13	48.97	7.81
本日所使用之 Standard：A			
(A)Acetanilide	(B)Atropin	(C)N-Anilin	
	N%	C%	H%
理論值：	10.36	71.09	6.71
測出值：	10.30	71.14	6.66
備註：			
費用核算：NCH：800 元			
報告日期：94 年 12 月 15 日			

儀器負責人簽章：謝有寧

技術員簽章：

技士李聰明

國立交通大學應用化學系

元素分析儀 Heraeus CHN-O Rapid 服務報告書

使用者姓名：蕭志祥		中心編號：941246	
服務單位：交大生科 張正實驗室		樣品名稱或代號：phNO ₂ A-1.5	
收件日期：94 年 11 月 18 日		完成日期：94 年 12 月 13 日	
分析結果： <i>Ph-NO₂A · 2H₂O · 2H₂O</i>			
實驗值：	N%	C%	H%
1.	9.38	47.19	7.38
2.	9.16	47.12	7.02
3.	<i>9.17</i>	<i>47.16</i>	<i>7.27</i>
推測值：	12.03	61.87	7.79
本日所使用之 Standard：A			
(A)Acetanilide	(B)Atropin	(C)N-Anilin	
	N%	C%	H%
理論值：	10.36	71.09	6.71
測出值：	10.44	71.34	6.50
備註：			
費用核算：NCH：800 元			
報告日期：94 年 12 月 15 日			

儀器負責人簽章：謝有容

技術員簽章：

技
士
李
慈
明

標準 m-dimer 1102A

國立交通大學應用化學系

元素分析儀 Heraeus CHN-O Rapid 服務報告書

使用者姓名：蔡政憲	中心編號：941011		
服務單位：交大生科 張正實驗室	樣品名稱或代號：m-dimer		
收件日期：94 年 9 月 28 日	完成日期：94 年 10 月 25 日		
分析結果：	$C_{28}H_{44}N_6O_8 \cdot 4HCl \cdot 6H_2O$		
實驗值：	N%	C%	H%
1.	9.88	40.01	7.22
2.	9.87	40.04	7.19
3.	<9.93>	<39.72>	<7.14>
推測值：	10.36	41.44	6.21
本日所使用之 Standard：A			
(A)Acetanilide (B)Atropin (C)N-Anilin			
	N%	C%	H%
理論值：	10.36	71.09	6.71
測出值：	10.42	71.18	6.77
備註：			
費用核算：NCH：800 元			
報告日期：94 年 11 月 01 日			

儀器負責人簽章：謝有容

技術員簽章：

技士李慈明