

國立交通大學

生化工程所

碩士論文

大環配位子 ODO2A 之穩定常數研究與
其鑰系金屬錯合物之水解磷酸酯鍵效力

The Stability Constants of Lanthanide Complexes of
ODO2A and the Promotion of BNPP Hydrolysis by
Lanthanide Complexes of ODO2A

研究生：王翊帆

指導教授：張 正 教授

中華民國九十六年一月

大環配位子 ODO2A 之穩定常數研究與其鑷系金屬錯合物之水解磷酸酯鍵效力

學生：王翊帆

指導教授：張正 博士

國立交通大學生化工程研究所 碩士班

摘要

我們對於將鑷系金屬大環錯合物運用在人工核酸水解酶的研究領域一直很感興趣，因為三價鑷系金屬陽離子具有良好的路易士酸、高配位數與高電子密度的特性，並且在水解DNA與RNA上已經有良好成果。而我們之前已經證實EuDO2A⁺在水解BNPP的效力十分優秀，幫助我們進一步去設計更好的人工水解酶。

在本篇論文，我們合成了新的多氮多氧多酸基的大環配位子ODO2A，並且透過電位滴定得到質子化常數與鑷系金屬錯合的穩定常數(LogK_m)，穩定常數介於10.76至12.60之間，稍微低於DO2A。而在水解BNPP的研究中，在高pH值對於LnODO2A⁺的反應速率與LnDO2A⁺相當，但是在pH 11以上則有反應速率下降的情形，這與LnNO2A⁺比較類似，應該是產生高活性的雙體之外，進一步產生了無活性的多體錯合物。在LnODO2A⁺中水解速率最快的為EuODO2A⁺。藉由改變EuODO2A⁺錯合物濃度，得到的k_{obs}與錯合物濃度的關係，套用到雙體平衡的模型，計算出雙體的反應速率為 $2.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ，比EuDO2A⁺略低；而雙體形成常數K_f = 12.29 M^{-1} ，與EuDO2A⁺差不多。

The Stability Constants of Lanthanide Complexes of ODO2A and the Promotion of BNPP Hydrolysis by Lanthanide Complexes of ODO2A

Student : I Fan Wang

Adviser : Dr. C. Allen Chang

Institute of Biochemical Engineering

National Chiao Tung University

Abstract

We have been interested in design of artificial nucleases and ribonucleases by employing macrocyclic lanthanide complexes. The cationic trivalent lanthanide (Ln^{3+}) ions and complexes are good Lewis acids and have been demonstrated to be effective DNA, RNA, and phosphodiester compounds' cleavage agents.

Previously we have reported the coordination properties of LnDO2A^+ and their kinetic behaviors of BNPP phosphodiester bond hydrolysis. To help designing better effective artificial nucleases and ribonucleases employing trivalent lanthanide complexes. In this paper, we report the synthesis of ODO2A (4,10-dicarboxymethyl-1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane). The protonation constants for ODO2A and stability constants with cationic trivalent lanthanide have been determined by potentiometric method. The results obtained are compared to those obtained in DO2A complex. LnODO2A^+ promotes BNPP hydrolysis at high pH have similar efficiently with LnDO2A^+ . But in pH 11, the decrease of efficiency which is similar to LnNO2A^+ that we believe is because the formation of an inactive polymer. The preliminary rate constants- $[\text{EuODO2A}^+]$ data at pH 10.5 were fitted to a monomer-dimer pre-equilibrium model, and the dimer rate constant is $2.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 10 times lower than that of EuDO2A^+ (2.3×10^{-2}). The dimer formation constant also obtained, which is 12.29 M^{-1} , is similar to that of EuDO2A^+ .

誌謝

在這兩年半的研究生生活讓我又比大學時了解了更多事

最感謝的是張正老師在各種領域的經驗談讓我對於更加認識了社會的多樣性，也讓我學到了科學的邏輯思考方式，希望能充分運用在我未來的人生事業發展上。

再來就是感謝我父母的支持，讓我能夠心無旁騖的完成碩士學位。還有實驗室的同學，菜頭、志祥、業林、郁頻，在平時的研究討論以及假日的娛樂都讓我這兩年來非常快樂。

最後就是來到這個實驗室遇到的幸怡，除了實驗上的幫忙以外，還要忍受我的任性以及壞脾氣，但是能夠有妳在旁邊一起畢業，這是讓我最高興的地方了。

還要感謝行政院國家科學委員會在研究經費上的支助



目錄

頁次

中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝	iii
目錄	iv
第一章、緒論.....	1
第二章、配位子的合成.....	16
1. N,N,N-tri(p-toluensulfonyl)diethylenetriamine 之合成	16
2. 1,5-bis(p-toluenesulfonyl)-3-oxapentane 之合成.....	16
3. 4,7,10-Tris(p-tolylsulphonyl)-1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane 之合成...	17
4. 1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane 之合成	18
5. 4,10-dicarboxymethyl-1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane 之合成	18
第三章、金屬離子的準備與標定	21
I. 藥品準備.....	21
II. 溶液配製	22
A. 0.05M Ca^{2+} 溶液的配製.....	22
B. 0.25M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ 溶液的配製.....	22
C. 指示劑的配製.....	22
D. 緩衝溶液的配製.....	22
E. 金屬離子溶液的配製.....	23
III. 金屬離子濃度標定步驟	23
A. EDTA 的標定.....	23
B. 過渡金屬離子的標定.....	23
C. 銻系金屬離子的標定.....	24
第四章、配位子 ONO2A 與銻系金屬穩定常數之研究.....	25
I. 實驗準備	25
A. 使用藥品.....	25
B. 使用儀器.....	25
C. 溶液配製.....	25
II. 配位子溶液濃度標定.....	26
A. TiNet 2.4 軟體設定.....	26
B. TMAOH 溶液的標定.....	27
C. 配位子 ODO2A 溶液的標定.....	27
D. 配位子 ODO2A 與 Ca^{2+} 錯合滴定.....	27
III. 配位子質子化常數之研究.....	30
A. 質子化常數計算原理.....	30

B. 質子化常數的計算.....	32
C. ODO2A 質子化常數.....	32
IV. 配位子與金屬離子穩定常數之研究.....	33
A. 穩定常數計算原理.....	33
B. 穩定常數的計算.....	35
C. ODO2A 與鑷系金屬的錯合穩定常數.....	36
D. ODO2A 與鑷系金屬的水解常數.....	37
第五章、金屬離子錯合物之動力學研究.....	39
I. 實驗準備.....	39
A. 使用藥品.....	39
B. 使用儀器.....	39
C. 溶液配製.....	39
II. 動力學研究.....	41
A. 實驗設計.....	41
B. 實驗環境.....	41
C. 計算原理.....	42
III. 結果與討論.....	43
A. CeODO2A ⁺ 的動力學研究.....	43
1. CeODO2A ⁺ 的光譜吸收.....	43
2. 監測 CeODO2A ⁺ 在不同 pH 值下的 294nm 吸收值隨時間 變化.....	44
3. CeODO2A ⁺ 在 pH 10.5 下的 294nm 吸收值隨時間變化的 濃度效應.....	46
B. LnODO2A ⁺ (Ln = Eu,Yb)水解 BNPP 反應在不同 pH 之效應.....	48
1. EuODO2A ⁺ 水解 BNPP 反應在不同 pH 之效應.....	48
2. YbODO2A ⁺ 水解 BNPP 反應在不同 pH 之效應.....	51
C. LnODO2A ⁺ (Ln = Eu,Yb)在同 pH 值下水解 BNPP 反應，錯合物 濃度變化效應.....	53
1. EuODO2A ⁺ 濃度效應.....	53
2. YbODO2A ⁺ 濃度效應.....	58
3. 不同錯合物之平衡常數與速率常數的比較.....	61
第六章、結論與未來展望.....	63
參考文獻.....	65
附錄	67

第一章、緒論

自然界生物使用 DNA 作為遺傳物質，並且利用 DNA 排列形成基因，轉錄成 mRNA，進一步形成具有功能的蛋白質。而為了保存如此龐大的基因庫，DNA 必須具有非常穩定的動力學特性，才可以將生命延續千萬年。而生物細胞在特定情形仍然需要分解 DNA 或 RNA，像是分解外來的 DNA、轉譯過的 mRNA 需被分解再利用、還有必須破壞並精確修補突變的 DNA 以致於基因能夠正確傳遞，這些任務都必須在細胞能控制的情況下完成，所以生物就產生了一系列的酵素稱為核酸水解酶(Nuclease，為 hydrolases 的一種)(圖 1-1)¹。

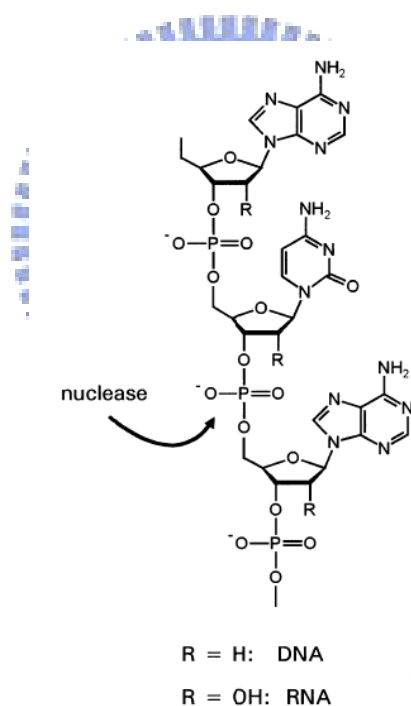


圖 1-1、DNA 與 RNA 之磷酸鍵被水解的位置

DNA 水解的步驟一般認為為兩步驟，一、藉由外來的親核基攻擊磷原子，形成五配位的中間態；二、移除位置 5 上的 5'-OH，並且 P-O 鍵斷裂。此步驟為速率決定步驟(圖 1-2)。

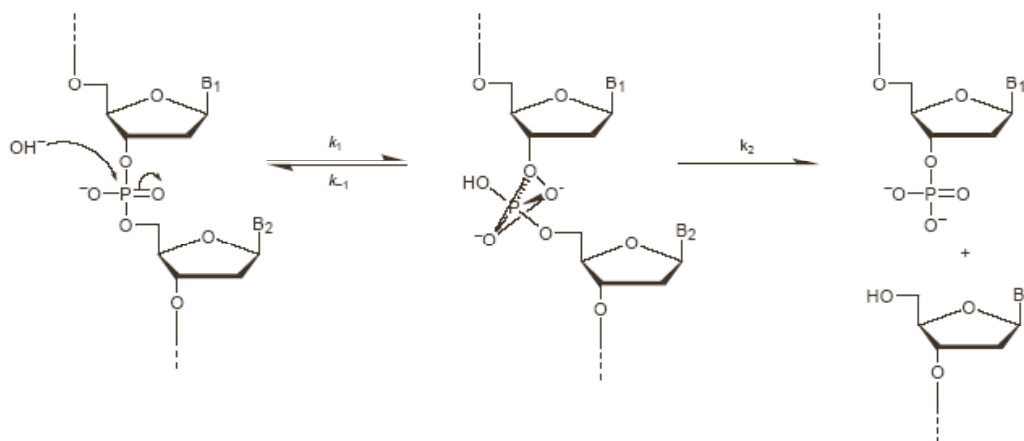


圖 1-2、DNA 水解步驟

而隨著研究發展，我們已經知道這些酵素中具有活性的關鍵在於金屬離子的參與，像是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 都是生物體常見的輔助因子(Cofactor)。酵素與這些金屬離子穩定的結合，讓金屬離子能在正確的位置上進行化學反應進而達到效果。所以近年來有許多研究者對於發展人工合成的水解酶具有興趣，合成了許多金屬錯合物，而研究必須有傳統的配位化學為強力的基礎，希望能夠合成好的錯合物並有效的催化 DNA、RNA 的水解。

而設計人工核酸水解酶最主要的目標是在於模仿限制酶(Restriction Enzyme)，同時具有辨識 DNA 序列的能力以及催化水解的效果。而我們希望能得到比自然界中只能辨識四到六個鹼基的限制酶更自由的人工核酸水解酶，只要調整辨識部分與受質的親和力以及活性部分的催化能力，相信在生物工程的領域的應用上具有極大的好處。

人工限制酶的研究最先還是要由活性開始，雖然我們已經知道金屬離子有參與水解過程，而詳細的化學反應其實仍未非常了解，但是我們知道好的金屬離子需要幾種特性以進行催化水解反應。一、與配位子形成適當的骨架；二、能夠活化磷酸雙酯鍵(Phosphodiester bond)；三、將電荷穩定來加速親核攻擊、穩定反應中間物以及離去基；四、本身為一強力親核物。

所以目前在人工核酸水解酶的研究上，多是基於上述要點所設計出來的金屬與氨基的錯合物，讓金屬離子與鹼基各為路易士酸及路易士鹼進行的雙官能基催化(Bifunctional Catalysis)來進行反應。

早期科學家藉由天然核酸水解酶為模型去發展人工水解酶，其中兩種核酸水解酶為 Alkaline phosphatase 及 Purple Acid phosphatase。這兩種核酸水解酶著名的地方在於利用雙金屬離子與酵素核心的氨基酸協同作用，來催化水解磷酸雙酯鍵。以前者為例，其經由兩步驟來催化水解過程，當雙金屬離子固定 DNA 序列，其中一個 Zn^{2+} 就會活化 $Ser_{102}-OH$ ，使其攻擊磷原子形成五配位的中間過度態，然後另一個 Zn^{2+} 所活化的配位水就會將 DNA 水解(圖 1-3)²。

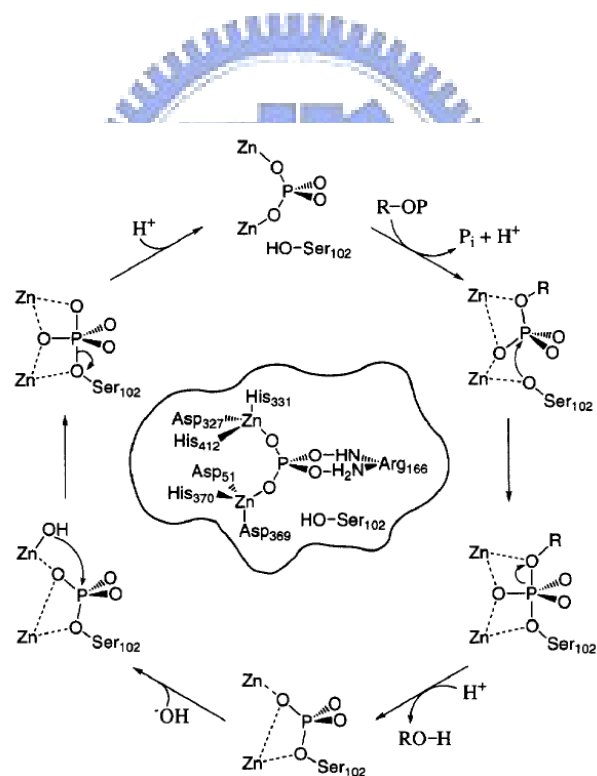


圖 1-3、Alkaline phosphatase 水解 DNA 之機制

1986 年，Ronald Breslow 團隊仿照 Alkaline phosphatase 合成了與 Zn^{2+} 錯合的含氮大環分子(圖 1-5,3)³，在 pH 增加到 8.7 時水解 DPPNPP 速率有顯著提升，他認為這時是金屬離子的配位水解離成氫氧根離子所造成的，

所以進一步推測反應是透過雙官能基催化的機制，由 Zn^{2+} 為路易斯酸活化磷原子，再讓金屬配位的氫氧根離子進行攻擊，達到水解的作用(圖 1-4)。之後他再進一步將大環錯合物加上了不同的官能基(圖 1-5,1,2)⁴，其水解效率又加快了九到二十倍，更驗證了將路易斯酸鹼組合在一個錯合物中，其水解效率會更快，類似天然酵素的雙官能基催化設計。

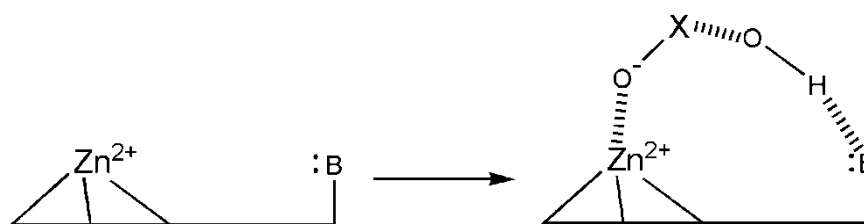


圖 1-4、雙官能基催化反應

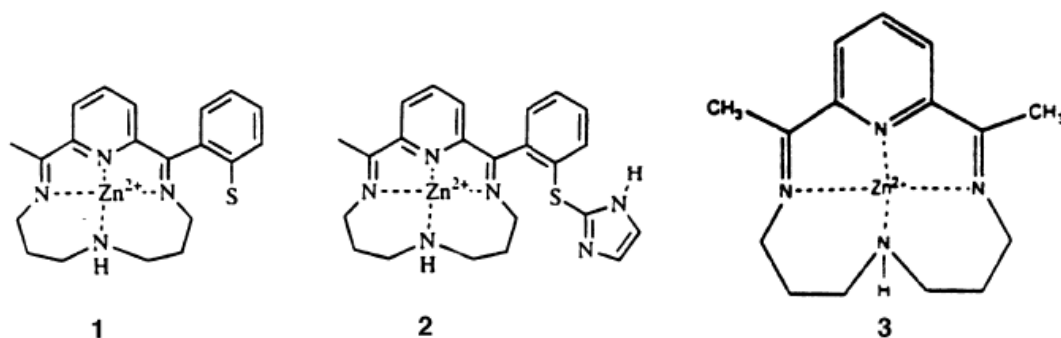


圖 1-5、Ronald Breslow 所合成的三種含氮大環錯合物，

假一次反應速率常數為 1、 $0.69(10^2 \text{ h}^{-1})$ ；2、 $1.50(10^2 \text{ h}^{-1})$ ；3、 $0.074(10^2 \text{ h}^{-1})$

1996 年，Krämer 團隊以雙官能基催化反應機構為基礎設計配位子(圖 1-6)⁵。其結構是由兩個吡啶環構成，並在吡啶環 2 的位置上接上烷基胺(alkylamine)作為胺基酸的類比物。兩個配位子，一個胺基上有一個氫，另一個則用甲基取代。兩者均配位上 Cu^{2+} 離子形成錯合物。

兩個錯合物去水解 BNPP 的結果， L^1Cu 的水解速率約為 L^3Cu 的 1000 倍，而 $(bpy)Cu$ 速率與 L^3Cu 相當。此結果說明了 L^1Cu 之所以具有較高的水

解效率，與其接上的類胺基酸官能基有很大關連，說明了磷酸酯鍵可能經由與金屬離子配位及 NMe_2H 形成氫鍵的雙重活化，再由 Cu^{2+} 的配位氫氧根離子攻擊磷原子，完成水解反應。

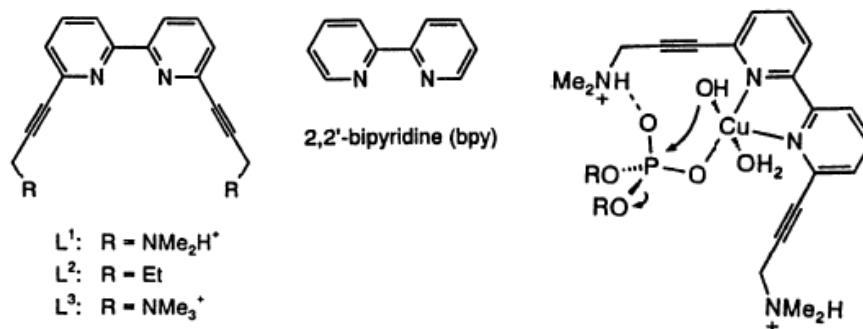


圖 1-6、Krämer 團隊所合成的 Cu^{2+} 配位子，進行水解 BNPP 的反應。
 L^1Cu 的 $K_{\text{cat}} = 4.4 \times 10^{-3}$ ； L^3Cu 的 $K_{\text{cat}} = 4 \times 10^{-6}$

從以上例子來看，仿照自然水解酶，用雙官能基催化基礎來設計人工水解酶的觀念是正確並且有效的。

另外從 1993 年起，Burstyn 團隊也開始研究金屬錯合物水解 BNPP 的機制，合成了三氮九元環的配位子與 Cu^{2+} 錯合 $(\text{Cu}[9]\text{aneN}_3\text{Cl}_2)^{6,7}$ 。Burstyn 將反應 pH 值提升到 7.3 時水解速率有顯著地提升，他認為此時是 $\text{Cu}[9]\text{aneN}_3\text{Cl}_2$ 的配位水解離，而因為配位水的解離讓錯合物具有反應活性，但是測量出的級數只有 0.5。於是她認為在此 pH 值，錯合物 Cu 上的配位水會互相結合形成雙體，而將具有反應活性的配位水阻擋了。她將實驗數據套用到下面所推測的反應機構(圖 1-7)，算出平衡常數 $K_f = 1220 \text{ M}^{-1}$ ，平衡傾向於雙體結構，並且失去了反應活性。

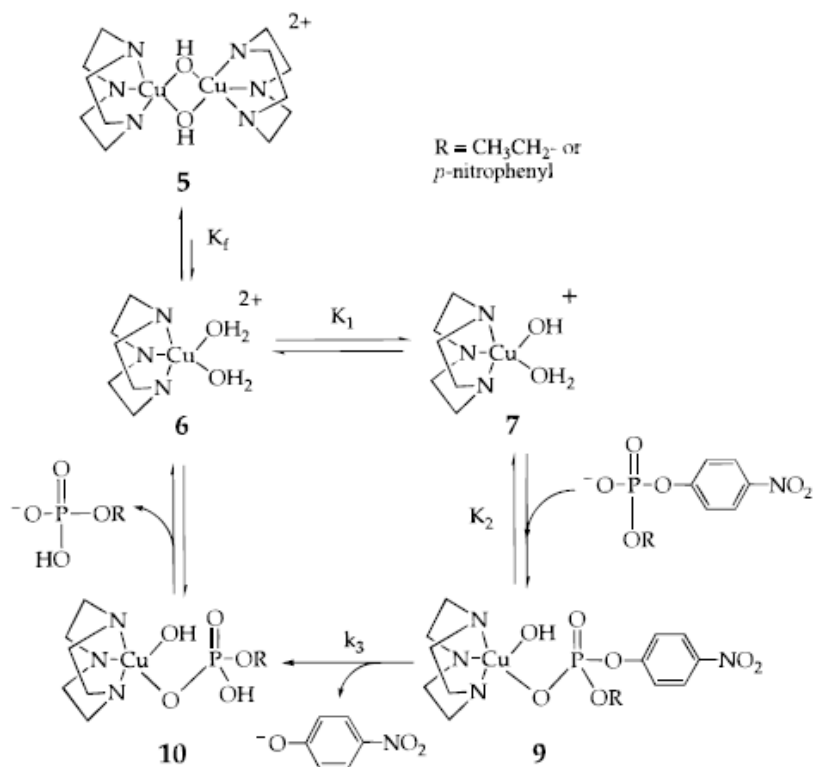


圖 1-7、Cu[9]aneN₃Cl₂ 水解 BNPP 的反應平衡式

然而天然酵素其實多半有兩個以上的金屬參與催化反應，1998 年 Morrow 就以此為概念，採用了 Burstyn 發展的三氮九元環來做雙體的研究，利用苯環橋接了兩個三氮九元環，合成了兩種雙體配位子(圖 1-8)⁸。經由滴定得知雙體在 pH 7.3 時配位水會解離形成 [Cu₂L(OH)₂]²⁺ 的型態，而在此條件下去水解 GpppG 得到的假一次速率常數，L²、L³ 為 L¹ 的 100 倍。在進一步的研究他觀察到隨著 L³ 雙體濃度上升，反應速率剛開始是二次趨勢，而高濃度處則有飽和的現象⁹，所以他推測 L³ 雙體與 GpppG 反應有 2:1 與 1:1 的反應機制(圖 1-9)，而套入到此模型計算出 2:1 組合的假一次速率常數為 1:1 組合的 20 倍。而 L² 雙體則只有 2:1 的反應組成，假一次速率常數為 4.3 × 10⁻⁵ s⁻¹。

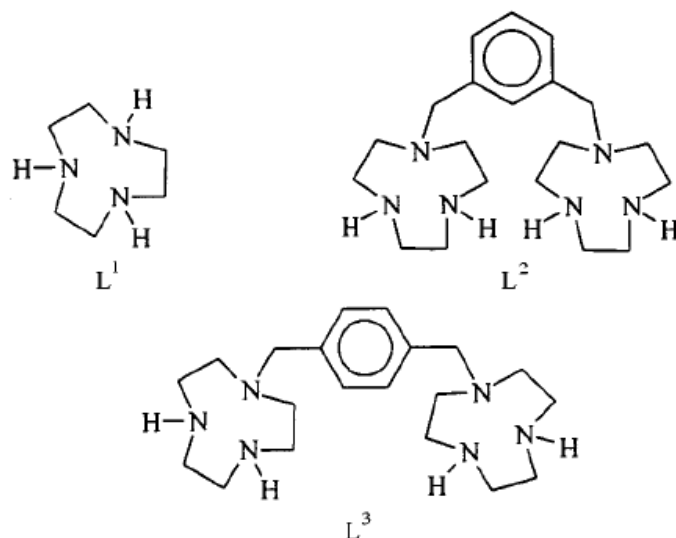


圖 1-8、Morrow 合成的兩種雙體，分別用 meta、para-xylene 來連接

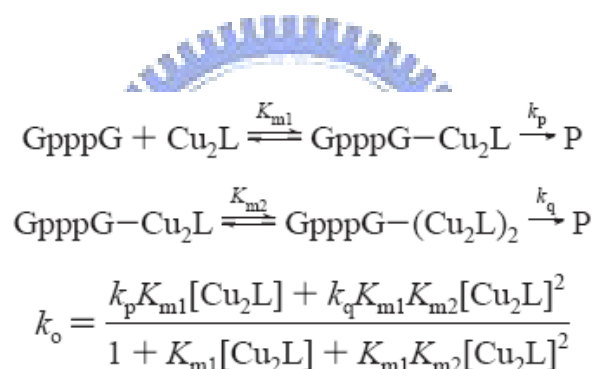


圖 1-9、Morrow 雙體反應模型

算出 L^3 之 $K_q = 1.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_p = 6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$

另外，Planalp 團隊在 2001 發表了他們的雙體錯合物 $(\text{Cu}(\text{Tach}-\text{Me}_3))^{2+}$ ，進行 BNPP 的水解也發現反應速率與錯合物濃度有二次的關係，顯示有兩個金屬錯合物共同水解一個 BNPP 的反應機構¹⁰，與 Morrow 觀察到的現象類似(圖 1-10)。經由套用到她推測的雙核反應模型後(圖 1-11)，得到 $K_M = 1/K_1 K_2 = 12.3 \text{ mM}^2$ 、 $K_{\text{cat}} = 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 。

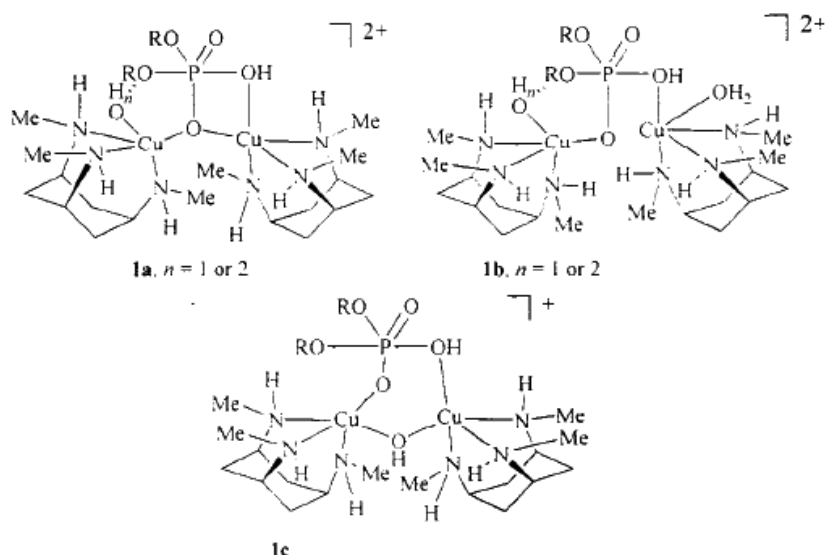


圖 1-10、Planalp 的金屬錯合物水解 BNPP 的推測機構

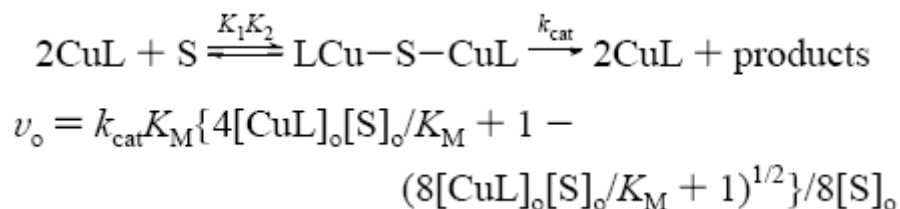


圖 1-11、簡化後的 Michaelis-Menten 方程式導出之
初始速率與金屬錯合物濃度關係式

2002 年 Burstyn 接續之前三氮九元環的研究，使用了三氮十元環、十一元環與 Cu^{2+} 錯合後進行水解 BNPP 的研究¹¹。結果觀察到隨著環穴變大，水解速率就會隨之增加，從九元環到十一元環速率常數增加了 8 倍，相對的雙體形成常數 K_f 則下降。從金屬錯合物結晶圖的分析結果觀察到，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會減小。兩個結果相互驗證，隨著配位水鍵角變小，錯合物在水溶液中形成雙體的立體阻礙就變大，使得水溶液中有活性的單體結構比例增加，因此反應速率相對的提升。而 Burstyn 繼續將三氮九元環的氮上加上了三個異丙基(圖 1-12)¹²，而此金屬配位子水解 BNPP 的反應初始速率比單純三氮九元環增加了 60 倍，而雙體形成常數 K_f 也低了約 9 倍，比三氮十元環、十一元環還低。

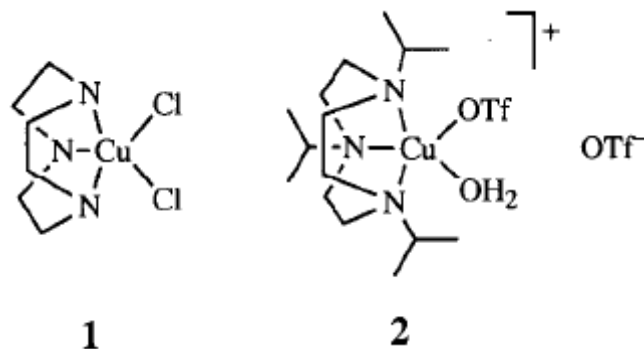


圖 1-12、加上了異丙基的三氮九元環

2003 年 Morrow 將兩個三氮九元環使用 1,3-dibromo-2-propanol 作為連接橋合成新的雙核配位子，而此新型雙核配位子錯合物也展現更快的水解磷酸酯鍵活性(圖 1-13)¹³。從滴定實驗觀察到所有雙體配位子都與二當量的 Zn^{2+} 有很高的親和力，而水解 HPNP 的動力學實驗結果顯示， $Zn_2(L2OH)$ 的二級反應常數是 $Zn(L1)$ 的 120 倍，而其他的雙體 (L3-L5) 只有 $Zn(L1)$ 的三到五倍，這結果強烈支持了 $Zn_2(L2OH)$ 的兩個金屬離子可藉由協同作用來穩定 HPNP 的中間過渡態的可能，大幅增加了水解速率。

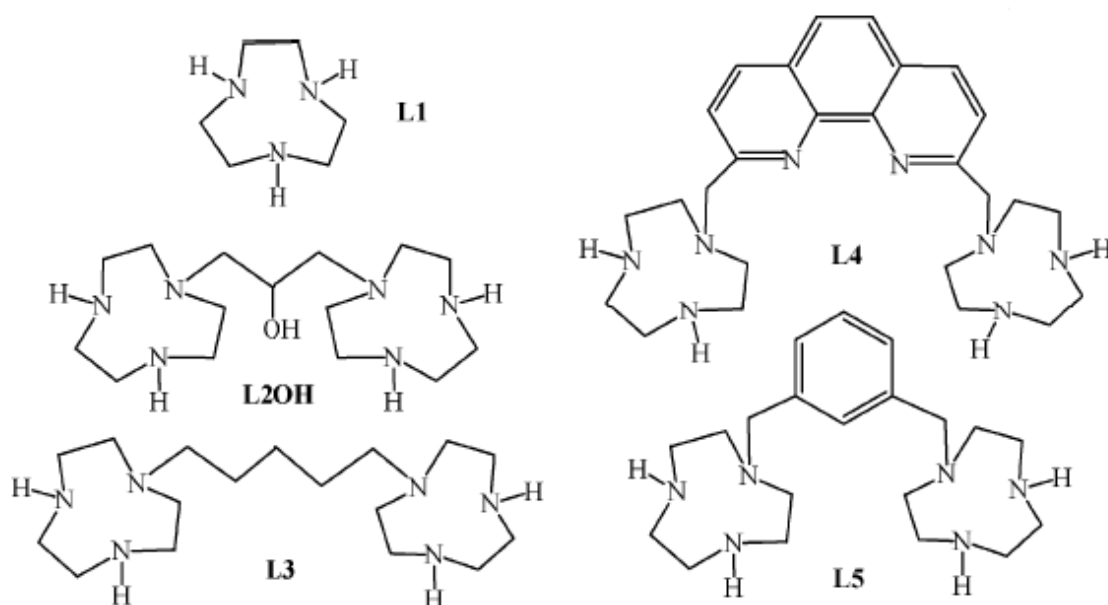


圖 1-13、Morrow 合成一系列新的雙核配位子，與 Zn^{2+} 錯合水解 HPNP 的速率常數為 $Zn_2(L2OH) = 25 \times 10^{-2}(M^{-1}s^{-1})$ 、 $Zn(L1) = 0.21 \times 10^{-2}(M^{-1}s^{-1})$ 。

綜觀以上的研究皆指出，仿照自然界的酵素所設計的雙核錯合物，反應性是值得肯定的，但是要有能夠穩定結合的配位子，並且要將兩個金屬配位在適合的位置，才能夠將速率增加。若沒有很好的控制結構，也會產生不具有活性的雙體，而將反應性降低。

生物體酵素中含的金屬離子多為 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 K^+ ，然而可以催化水解反應的金屬離子還有許多， Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 以及 Ln^{3+} (鑰系金屬)^{14,15} 都可以進行水解反應中的親和性攻擊反應。雖然鑰系金屬離子在水溶液下是有效率高的 DNA 切割試劑，但其在高 pH 值的水溶液下會產生沈澱，且會對生物體產生毒性。

在 MRI (magnetic resonance imaging) 核磁共振造影試劑的研究經驗中，大環配位子比線性配位子對鑰系金屬所形成的錯合物具有更高的穩定性¹⁶。所以有許多研究者就運用了鑰系金屬配合各種大環配位子，也展現了良好的水解效率，並且明顯的其他金屬好。這是因為鑰系金屬具有較高的氧化態、電荷密度、較多的配位數以及快速的配位子交換速率，這些特性使得鑰系金屬離子非常適合做為人工水解酶的催化中心¹⁷。

1992 年 Morrow 團隊發表了第一篇使用鑰系金屬錯合物來催化水解 RNA 結構的研究¹⁸，此鑰系金屬錯合物具有非常高的熱力學穩定性(圖 1-14)。此外，Morrow 團隊還發表了單純使用鑰系金屬離子來進行 RNA 的轉酯催化反應，反應性比過渡金屬離子快很多¹⁹。

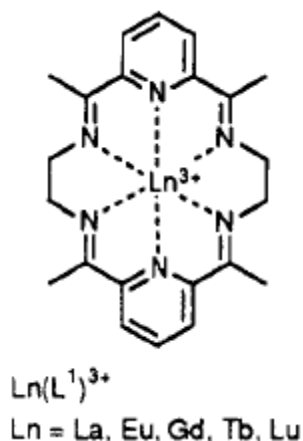


圖 1-14、Morrow 發表之鑰系金屬大環錯合物

1996 年 Morrow 團隊又使用新的配位子，八配位的 TCMC 以及七配位的 NBAC²⁰。觀察到以十配位的 La^{3+} 與 TCMC 錯合後，具有水解 RNA 結構的效果，而與九配位的 Eu^{3+} 錯合後就失去了活性。另外將 Eu^{3+} 與七配位的 NBAC 錯合，則具有水解效果。所以他在這裡推測，金屬錯合物必須具有兩個配位水，才能發揮催化水解反應的效果。

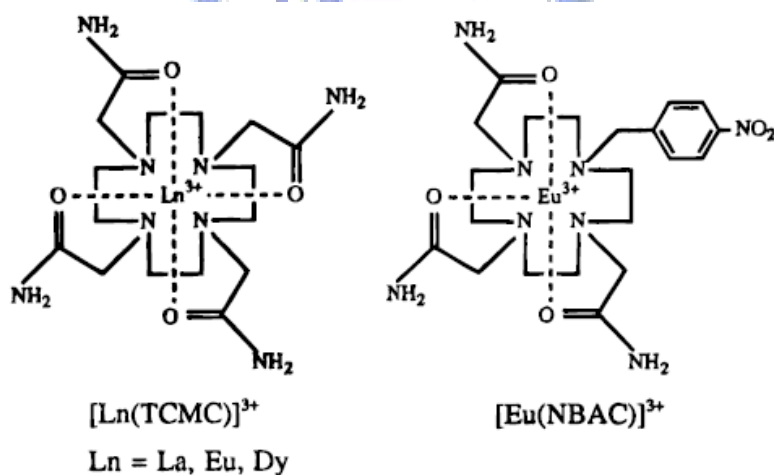


圖 1-15、TCMC 以及 NBAC 與鑰系金屬錯合的結構圖

接著 Morrow 團隊接續發表了其他以 Cyclen(四氮十二元環)為基礎的鑰系金屬大環配位子(圖 1-16)²¹。皆由改變氮原子上所接的官能基，希望能展現更優秀的水解效果，而其中 THED 在水解 mRNA 的 5'Cap 結構有顯著效率。

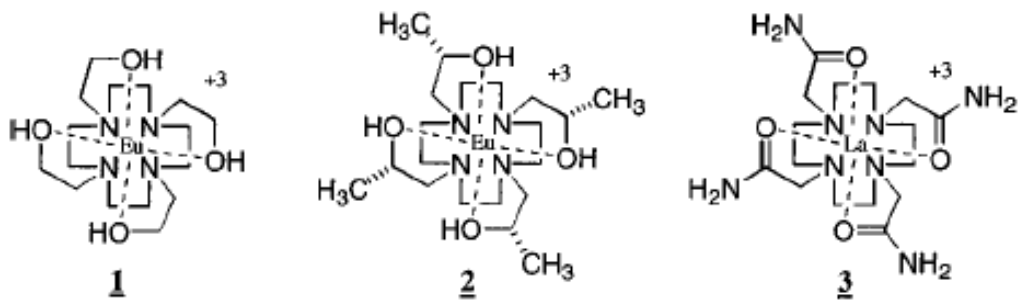


圖 1-16、三種 Cyclen-based 鑰系金屬錯合物，
1 為 EuTHED^{3+} 、2 為 Eu(s-THP)^{3+} 、3 為 LaTCMC^{3+}

2005 年 Gunnlaugsson 團隊也發表了以 Cyclen 為基礎的大環錯合物²²，他們錯合了 La^{3+} 及 Eu^{3+} 後進行水解 HPNP 的實驗，觀察到 La^{3+} 錯合物的催化速率會隨著 pH 值上升，在 pH 8.5 後則下降，但是 Eu^{3+} 的錯合物並沒有此現象。他們推測應該是 La^{3+} 比 Eu^{3+} 多了一個配位水，造成 pH 上升後兩個配位水皆解離而失去反應活性(圖 1-17)。

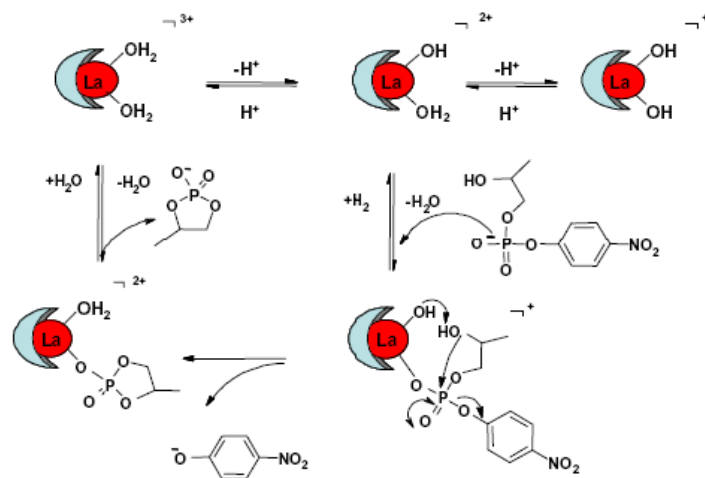


圖 1-17、 La^{3+} 錯合物配位水變化與水解 HPNP 的機制。

而我們實驗室近年來主要以三氮九元環以及四氮十二元環的衍生物並配合鑰系金屬來進行人工水解酶的研究，運用張正指導教授在 MRI 顯影劑的經驗，利用加上乙酸基的大環錯合物，與鑰系金屬錯合後，整個金屬錯合物就會為中性或帶正電，有助於與帶負電的磷酸鍵結合。而且這些大

環錯合物與鐳系金屬錯合的穩定性也是非常優秀的，目前仍應用在人體的 MRI 造影上(圖 1-18)²³。

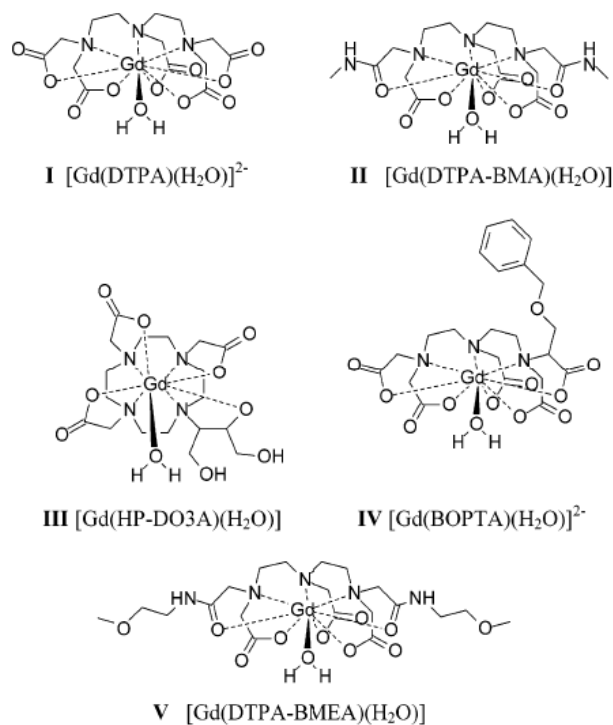


圖 1-18、目前 FDA 核准的 MRI 顯影劑，圖中 III 為四氮十二元環帶酸之基衍生物

近年來對於以 DO₂A (圖 1-19)為主的大環錯合物之動力學研究已有相當的了解，在前人的研究中，已經觀察到 DO₂A 是一個具有熱力學穩定性²⁴ 以及動力學惰性(Kinetically inert)的錯合物，與鐳系金屬的錯合穩定常數皆很高(LogK > 13)，是非常好的金屬錯合物。而本實驗室已經研究了不同鐳系金屬與 DO₂A 錯合後的水解效率，發現以 EuDO₂A⁺有最優秀的催化能力。而接著再與配位數不同的 EuK₂1DA⁺、EuEDDA⁺錯合物水解 BNPP 能力做比較，觀察到配位水越多水解效果越好²⁵。

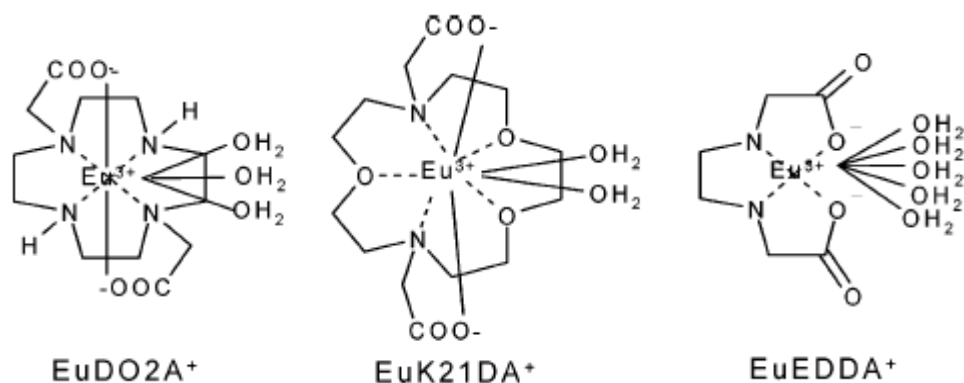


圖 1-19、本實驗室所發表的 Eu^{3+} 錯合物

所以接著本實驗室就轉向配位數少一個的 NO2A 進行研究，希望能保持金屬錯合物的穩定常數並且增加配位水數量以達到更好的水解效果。另外為了防止多體(Polymer)化合物的生成，如 Burstyn 所敘述一樣，我們也加入了具有立體張力的取代基來抑制多體的產生(圖 1-20)。而得到的結果是 NO2A 的確容易形成雙體，不過 Yb^{3+} 之錯合物部分級數(Order of LnL)小於 1，而 Eu^{3+} 錯合物級數則大於 1。這也許是 Eu^{3+} 在產生不具有活性雙體前，會有比單體更具有活性的雙體結構產生。而 PhNO2A 則是穩定常數下降太多，切割效率並不是很好²⁶。

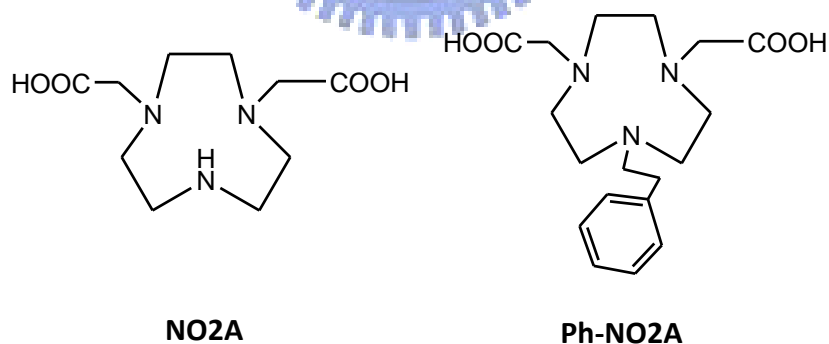
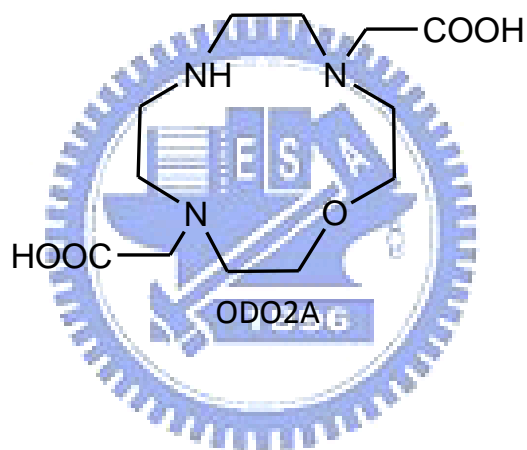


圖 1-20、NO2A 與 Ph-NO2A

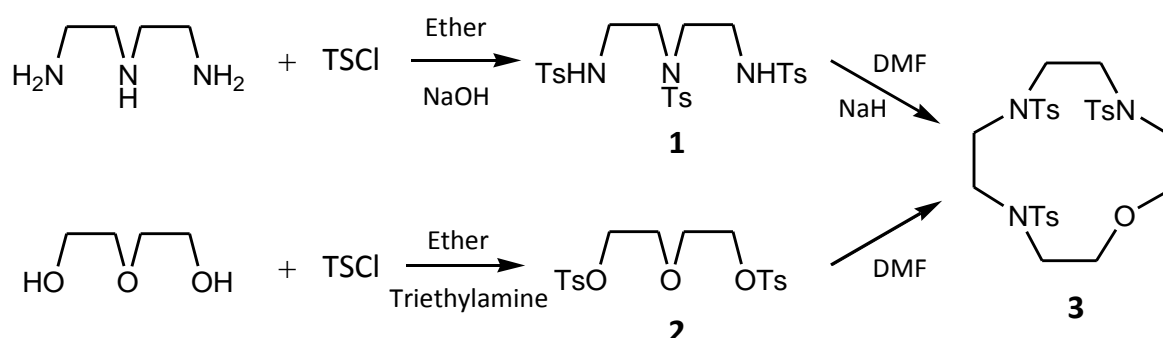
在大環配位子的研究中，除了常用的氮原子做為 Donor 以外，也有人研究用氧原子替換氮原子的大環配位子，發現對於金屬離子的選擇性增強，也就是比起替換前的大環配位子對於不同的金屬離子穩定常數增加或減少，而大環錯合物的構型也會有所改變^{27,28,29}。

- 所以我們合成新的配位子 ODO2A，將 DO2A 其中一個氮原子置換成氧原子。
- 研究 ODO2A 的熱力學以及與鏷系金屬錯合之配位化學。
- 研究 LnODO2A^+ 水解 BNPP 的動力學。
- 比較 ODO2A 與 DO2A 的水解效力。



第二章、配位子的合成

Scheme 1



1. N,N,N-tri(p-toluenesulfonyl)diethylenetriamine

取 0.1 mol 之 Diethylenetriamine 液體到圓底燒瓶中，再取 0.3 mol NaOH_(s) 溶於 100 ml 二次水中，也倒入圓底燒瓶混合攪拌、冰浴。另外取 0.3 mol 的 TsCl_(s) (p-toluenesulfonyl chloride) 溶於 300 ml 乙醚中，用等壓漏斗緩緩滴入圓底燒瓶中，耗時約三到四小時滴完。之後取出攪拌子，換用電動攪拌器劇烈攪拌 12 小時以上，反應完的產物用減壓過濾後，用二次水後再用酒精沖洗數次，得到白色的粗產物。將粗產物用約 1.5 L 的酒精再結晶，得白色細緻粉末。

產率：75%

熔點：173-175°C

2. 1,5-bis(p-toluenesulfonyl)-3-oxapentane

取 0.1 mol 之 Diethyleneglycol 液體到圓底燒瓶中，再取約 100 ml 之 Triethylamine 液體也倒入圓底燒瓶混合攪拌、冰浴。另外取 0.2 mol 的 TsCl_(s) 溶於約 200ml 乙醚中，用等壓漏斗緩緩滴入圓底燒瓶中。滴完取出攪拌子，換用電動攪拌器劇烈攪拌 12 小時，反應完的產物用減壓過濾後，用二次水後再用酒精沖洗數次，得到白色的粗產物。將粗產物用約 300 ml 的酒精再結晶，得白色針狀結晶。

產率：92% 熔點：79-82°C

3. 4,7,10-Tris(p-tolylsulphonyl)-1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane³⁰

取 1 0.1 mol(約 56.5g)溶於約 300ml DMF 中，再取 20g 的 Sodium hydride 粉末，分多次緩緩加入其中攪拌反應，過程可冰浴。加完後持續反應約 20 分鐘，減壓過濾得澄清橙色液體，轉移至圓底燒瓶。取 2 0.1 mol(約 41.4g)溶於約 200ml DMF 中，用等壓漏斗緩緩滴入圓底燒瓶中，並用 110°C 油浴，攪拌反應 12 小時。將反應後的溶液減壓濃縮至約 150ml，會有黃色固體析出，將此溶液緩緩倒入劇烈攪拌的二次水中，會有白色固體析出，過濾後並用二次水清洗，得到粗產物。接著用 Chloroform 加熱溶解粗產物，如還有顯著水層，可用分液漏斗去除。再加入二倍量的熱酒精與之混合，靜置再結晶，可得白色粉末。

產率：77%

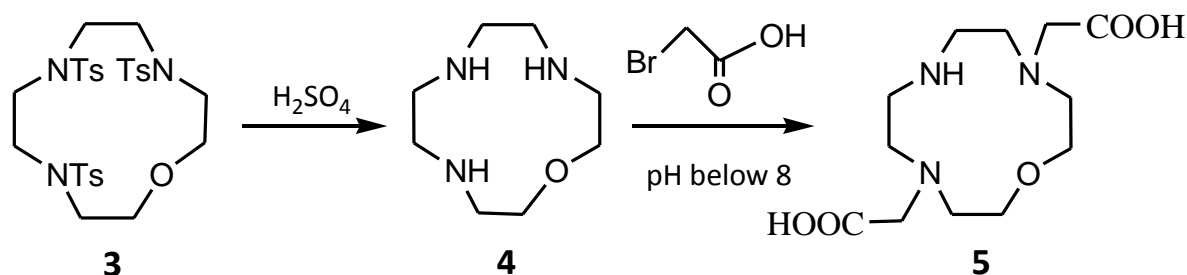
熔點：194-198°C

討論：

再結晶步驟中 Chloroform 與酒精混合時，盡量將兩者都加熱至沸騰，再將酒精一口氣倒入 Chloroform 裡，盡量用大一點的燒杯，小心不要讓其溢出。混合後留在還有餘溫的加熱板上，慢慢降溫，會結的比較漂亮。加熱不夠的話容易很快就析出固體，純度就會下降，粉末也許會帶點黃色。因為接下來 Detosylation 的步驟後沒有適當的純化方法，所以這裡的產物純度要盡量提高。



Scheme 2



4. 1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane^{30,31}

將得到的 **3** 約 49g 都倒入圓底燒瓶，加入約 150ml 濃硫酸，油浴 140°C ，攪拌約 1 天後，溶液變成黑色。反應後將溶液分多次緩慢倒入 1L 攪拌中的冰乙醚，會有灰黑色的黏狀固體析出黏於燒杯壁，倒完後靜置一下，就可把大部分的乙醚直接倒掉，留下黏狀固體。加入二次水將固體溶解，並加熱約 60°C 除去多餘的乙醚，此時再加入適量活性炭脫色以及 $\text{BaCO}_{3(s)}$ 去除多餘硫酸，約加熱 30 分鐘，過濾後得到澄清溶液，若體積太大可用減壓濃縮至約 200ml 左右。用約 12N 的濃 $\text{NaOH}_{(aq)}$ 將溶液調成 pH12 以上，再用 Chloroform 萃取數次，收集有機層，並加入 $\text{MgSO}_{4(s)}$ 去除多餘水分，過濾後抽乾可得約 9g 白色固體 **4**。

產率：72%

熔點： $78-79^\circ\text{C}$

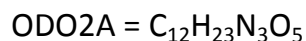
5. 4,10-dicarboxymethyl-1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane²⁷

取 2g 的化合物 **4** 溶於約 25ml 的二次水中，再取兩倍當量的 Bormoacetate 粉末也溶於約 25ml 二次水中，兩者混合攪拌。使用 pH 儀監測溶液 pH 值，用 3N NaOH 持續調整 pH 值不超過 8，並用約 50°C 的油浴，反應兩天，直到 pH 值約保持在 8 不再下降。反應後用 6N HCl 將溶液的 pH 調至 2 後，減壓濃縮抽乾，得到黃色固體。加入適量甲醇將固體溶解，會有白色鹽類沉澱，過濾後留下甲醇溶液。再將甲醇溶液抽乾，用水溶解，之後通過陽離子交換樹脂，把大部分雜質去除後，用鹽酸與酒精再結晶，可得白色粉末約 1.1g。產率：35%

討論：

因為這個步驟在參考資料中會有接上三個酸的情況產生，但是經過嘗試後，發現用二當量的酸去反應並且將 pH 上限降至 8，比起前人的作法(三當量、pH 小於 8.5)得到的結果，大部分產物都是接上兩個酸的產物，這樣也使得之後的純化更為簡單。再來就是前人用甲酸態的陰離子交換樹脂來分開兩個酸及三個酸的產物³¹，但是我們實驗室嘗試使用陰離子純化，皆無法將產物留在管柱內，而無法有效的分離。所以只透過陽離子交換樹脂將反應完的多餘的酸以及之前大環存在的雜質去除，因為經過修正的方法產生的產物大部分為兩個酸，所以稍微純化後的產物收集起來，加入適量的鹽酸溶解，用約 50°C 慢慢減壓濃縮，濃縮至適量體積，趁熱緩緩加入純酒精至有白霧狀產生但是搖勻後會慢慢消失的程度，靜置一晚，即有結晶產生。看到結晶後就多放幾天，再放到冰箱一兩天，讓結晶多一點。之後就把結晶濾出來，用冰的稀釋至 90% 左右的純酒精稍稍洗過，晾乾後用濃縮儀將剩餘酒精抽乾，即可得到純的產物。

元素分析結果：



	N%	C%	H%
實驗值	10.12 ± 0.06	35.53 ± 0.1	6.89 ± 0.02
$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot 3\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	10.09	34.58	6.77
$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot 2.8\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	10.27	35.20	6.84
$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot 2.7\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	10.36	35.51	6.88
參考文獻 ²⁷	10.25	36.45	6.80

由元素分析來看，我們合成出來的 ODO2A 應該帶有一個水及三個鹽酸，而再結晶時理論上鹽酸不一定會足夠三個，所以實驗結果比較接近 2.7 個鹽酸左右，而這個推測在之後的滴定可以進一步確認。

NMR 結果：

使用儀器：交通大學貴重儀器中心 Varian UI-500 500MHz

Solvent：D₂O

¹³C：δ42.05、δ50.35、δ52.59、δ55.58、δ66.29、δ170.0 ppm

¹H：δ3.26,3.27,3.28、δ3.34,3.35、δ3.68,3.69,3.70、δ3.89 ppm

圖譜見附錄一、二

MS(ESI⁺)結果：

使用儀器：交通大學貴重儀器中心 Waters Q-ToF LC-MASS

M/Z 290.1 100%

圖譜見附錄三

第三章、金屬離子的準備與標定

為了精確求得配位子對金屬離子的穩定常數，兩者的濃度都必須仔細標定。配位子的標定我們利用電位滴定(Potentiometric Titration)來確定，而金屬離子則用標準的配位子試劑 EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid)配合適當的指示劑直接滴定來確定濃度，EDTA 有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(圖 3-1)，當所有金屬陽離子皆與配位子反應後，即達滴定終點(end point)，其莫耳比率為 1 : 1。

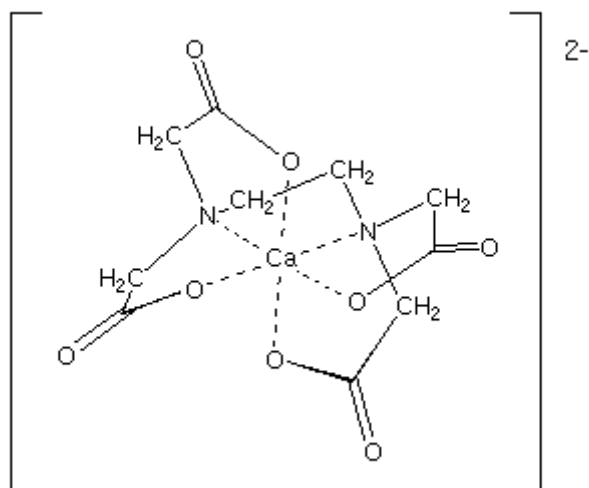


圖 3-1、EDTA 與 Ca^{2+} 錯合情形

I. 使用藥品

Lanthanide(III) nitrate hydrate ($\text{Ln}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) 皆為 Aldrich 99.5% 以上等級試藥，過渡金屬 Nickel(II)-nitrate hexahydrate($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、Copper(II) nitrate trihydrate ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、Zinc(II) nitrate hexahydrate ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)皆為 Merck G.R 級試藥，Calcium carbonate (CaCO_3) 為 Merck G.R 級試藥，disodium ethylenediamine tetraacetic acid ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$)為 Merck G.R 級試藥。Buffer 材料及指示劑皆為 Aldrich A.C.S 及 Riedel-de Haën A.C.S 級試藥。

II. 溶液配製

A. 0.05M Ca^{2+} 溶液的配製

將 $\text{CaCO}_3(\text{s})$ ($M=100.09 \text{ g/mol}$) 放置在 100°C 的烘箱 2-3 小時，烘乾後稱取 0.5004 克，小心地滴入 12N $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 將 $\text{CaCO}_3(\text{s})$ 慢慢溶解，最後再用 100 ml 的定量瓶稀釋成 0.05M 的 Ca^{2+} 溶液。

B. 0.25M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ 溶液的配製

稱取 9.306 克 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}_{(\text{s})}$ ($M=372.24 \text{ g/mol}$)，將之溶解後用 100ml 的定量瓶稀釋成約 0.25M 的溶液。

C. 指示劑的配製

1. 取 Erichrome black T (EBT) 粉末 0.2g，用 20ml 定量瓶將之加水稀釋成 1% 的溶液。
2. 取 Murexide 粉末 0.02g，用 10ml 定量瓶將之加水稀釋成 0.2% 的溶液。
3. 取 Xylenol Orange Tetrasodium Salt 粉末 0.2g，用 20ml 定量瓶將之加水稀釋成 1% 的溶液。

D. 緩衝溶液的配製

1. pH=10、0.1M， $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 緩衝溶液的配製：取 0.5349g $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{s})}$ ($M=53.49 \text{ g/mol}$)，溶於少量水，再用 $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}$ (29%) 調整 pH 值至 10，再補水至 100ml。
2. pH=8、0.1M， $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 緩衝溶液的配製：取 1.337g $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{s})}$ ($M=53.49 \text{ g/mol}$)，溶於少量水，再用 $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}$ (29%) 調整 pH 值至約 8，再補水至 250ml。
3. pH=5.5、0.1M， $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 緩衝溶液的配製：取 1.5g $\text{CH}_3\text{COOH}_{(\text{aq})}$ ($M=60.05 \text{ g/mol}$)，混於少量水，再用適當濃度的 $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ 調整 pH 值到約 5.5，再補水至 250ml。

E. 金屬離子溶液的配製

鑷系金屬 Lanthanide(III)皆配製成約 20mM、20ml 的溶液，其餘金屬則配製成約 0.1M、100ml 的溶液，再進行濃度標定。

III. 金屬離子濃度標定步驟

A. EDTA 的標定

取 5ml Ca^{2+} 溶液以及 10ml pH10 buffer 混合於小燒杯中，加入兩滴 Murexide 指示劑，將 EDTA 溶液滴定至燒杯裡，到達當量點時，溶液由粉紅變紫。EDTA 與 Ca^{2+} 為一比一當量錯合，而由多次滴定的當量點平均值推算出精確的 EDTA 濃度。

B. 過渡金屬離子的標定

1. Cu^{2+}

取 1ml EDTA 溶液及 5ml pH 8 的 buffer 混合於小燒杯中，加入兩滴 Murexide 指示劑，將 Cu^{2+} 溶液滴定至燒杯中，到達當量點時，溶液由粉紅色變為藍色，以一比一當量去計算 Cu^{2+} 的濃度。

2. Ni^{2+}

取 1ml EDTA 溶液及 5ml pH 10 的 buffer 混合於小燒杯中，加入兩滴 Murexide 指示劑，將 Ni^{2+} 溶液滴定至燒杯中，到達當量點時，溶液由粉紅色變為藍紫色，以一比一當量去計算 Ni^{2+} 的濃度。

3. Zn^{2+}

取 1ml EDTA 溶液及 5ml pH 10 的 buffer 混合於小燒杯中，加入兩滴 Murexide 指示劑，將 Zn^{2+} 溶液滴定至燒杯中，到達當量點時，溶液由粉紅色變為黃色，以一比一當量去計算 Zn^{2+} 的濃度。

4. Cd^{2+}

取 1ml EDTA 溶液及 5ml pH 10 的 buffer 混合於小燒杯中，加入兩滴 Murexide 指示劑，將 Cd^{2+} 溶液滴定至燒杯中，到達當量點

時，溶液由粉紅色變為橙色，以一比一當量去計算 Cd^{2+} 的濃度。

C. 鑷系金屬離子的標定

取 2ml Ln^{3+} 溶液及 8ml pH 5.5 的 buffer(因為鑷系金屬在高 pH 值容易產生沉澱)混合於小燒杯中，加入兩滴 Xylenol Orange Tetrasodium Salt 指示劑，將 EDTA 溶液滴定至燒杯中，到達當量點時，溶液由橙色變亮黃色，以一比一當量去計算 Ln^{3+} 的濃度。



第四章、配位子質子化常數與金屬離子穩定常數之研究

I. 實驗準備

A. 藥品準備

- 配位子 ODO2A
- 金屬陽離子溶液 (前章節所準備的溶液)
- Tertramethylammonium hydroxide ($(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$) , ~10% in water , Fluka
- Tertramethylammonium chloride ($(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$) , >98% , Merck
- Potassium hydrogen phthalate (KHP) , $100\pm 0.05\%$, Merck(volumetric standard)

B. 使用儀器

- Metrohm 702 SM Titrino 自動滴定儀
- Metrohm LL Micro glass electrode 6.0234.100
(電極使用 pH 4、7、10 之緩衝液(Riedel-de Haën)進行三點校正)
- Metrohm TiNet 2.4 自動滴定儀操作軟體
- Firstek Scientific B204 恆溫循環水槽

C. 溶液配製

1. 配製一級標準酸 KHP 溶液：取適量的 $\text{KHP}_{(s)}$ ($M=204.23 \text{ g/mol}$) , 放置在烘箱 120°C 8 小時，之後秤取 2.0423g，用 50ml 定量瓶配製成 0.2M 的 KHP 溶液。
2. 配製 Tertramethylammonium hydroxide (TMAOH) 鹼液：取 22.73ml 的 TMAOH 母液，以 50ml 定量瓶稀釋配製成約 0.5M 的滴定用 TMAOH 溶液。裝在 100ml SCHOTT 血清瓶中，換上 Metrohm 的蓋子，接上鹼石灰(Sodalime, Merck)瓶吸收 CO_2 ，再接上輸送管連接至 702 滴定儀。

3. 配製 Tertramethylammonium chloride (TMACl)溶液：取適量的 TMACl_(s) (M=109.6 g/mol)，放置在烘箱乾燥數小時，之後秤取 4.38g，用 20ml 定量瓶配製成 2M 的 TMACl 溶液。
4. 配製 ODO2A 配位子溶液：依照元素分析的結果去推測所得到的配位子分子式應為 ODO2A · (2.7~3)HCl，在這裡先以 3 HCl 為準計算分子量為 M=416.724 g/mol，去配製實驗會用到的 40mM 以及 10mM 溶液，40mM 一次可配 20ml、10mM 的可配 50ml 為適量。配製好的溶液盡量避光儲存，以免有未知的光化學反應影響實驗結果。

II. 配位子溶液濃度標定

為了要精確的標定配位子的濃度，我們使用電位滴定法，直接滴定配位子可決定濃度以及質子化常數；再與金屬離子一起滴定以確定配位子濃度及金屬的錯合穩定常數。實驗環境保持在 0.10M 的離子強度下(使用 TMACl 調整)，而配位子的濃度為 1-2mM，金屬離子則輕微過量 2%~5%。在這實驗環境下配位子會與金屬離子產生 1:1 的錯合。

A. TiNet 2.4 軟體設定：

主要設定參數為 V_{step} (每滴體積)、Signal Drift(訊號變動上限值)、equilibrium time(每滴最大平衡時間)、 V_{stop} (滴定終止體積)。

B. TMAOH 溶液的標定：

實驗容器為帶有回流外層的滴定杯，以 25°C 的水回流恆溫，上面以具有 O 環的專用多孔蓋子蓋上，插入專用電極以及專用滴管將內部隔絕，底部則有小型電動攪拌子進行攪拌。

滴定杯加入 0.5ml 的 KHP(0.2M)溶液以及 4.5ml 的二次水。

TiNet 設定為

$$V_{\text{step}} = 0.004\text{ml}$$

$$V_{\text{stop}} = 0.3\text{ml}$$

signal Drift = 5 mv/min

equilibrium time = 100 s

重複 3-5 次滴定，由軟體所定出的反曲點平均，求得 TMAOH 的精確濃度。

C. 配位子 ODO2A 溶液的標定

滴定環境為 2mM、 $\mu=0.1\text{M}$ 、5ml。取 1ml 的 ODO2A(~10mM) 溶液，用 0.25ml TMAOH (2M) 補足離子強度，再加 3.75ml 二次水將溶液配成 5ml。使用 0.5M 的 TMAOH。TiNet 設定為

$$V_{\text{step}} = 0.001\text{ml}$$

$$V_{\text{stop}} = 0.14\text{ml}(\text{先估算超過配位子六倍的當量})$$

signal Drift = 1 mv/min

equilibrium time = 200 s

會在約第三個及第四個當量處出現反曲點。(圖 4-1)

D. 配位子 ODO2A 與 Ca^{2+} 錯合滴定

滴定環境為 2mM、 $\mu=0.1\text{M}$ 、5ml。取 1ml 的 ODO2A(~10mM) 溶液，以及過量 5% 的 105.9 μl 的 Ca^{2+} 溶液(0.09915M)，TMAOH(2M) 為 225 μl ，補水至 5ml。使用 0.5M 的 TMAOH

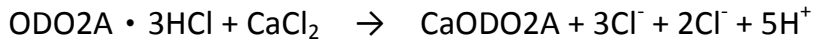
在這裡離子強度計算方式為

$$\mu = 1/2 \{ [A]a^2 + [B]b^2 + [C]c^2 + \dots \}$$

[A]、[B]、[C] ...代表該 A、B、C...離子的莫耳濃度；

a、b、c...則代表 A、B、C...離子的電荷

若反應式為



$$\mu = [3(-1)^2 + 2(-1)^2 + 5(+1)^2] / 2 = 5$$

如配 5.0ml，配位子濃度 2.0mM， $\mu=0.10\text{M}$ 之滴定溶液

需補 2M TMACl_(aq)： $[(0.10 - 5 \times 0.002) \times 5.0] / 2 = 0.225 \text{ (ml)}$

TiNet 設定為

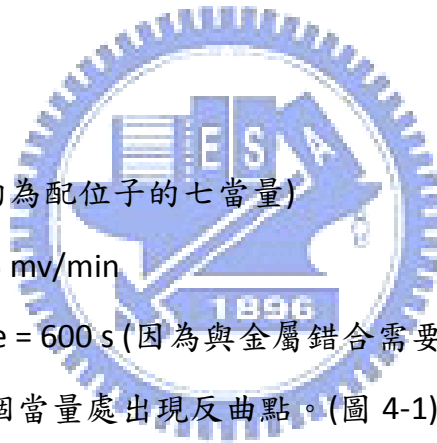
$$V_{\text{step}} = 0.001\text{ml}$$

$$V_{\text{stop}} = 0.14\text{ml} \text{ (約為配位子的七當量)}$$

$$\text{signal Drift} = 0.5 \text{ mv/min}$$

equilibrium time = 600 s (因為與金屬錯合需要較長之反應時間)

會在大約第五個當量處出現反曲點。(圖 4-1)



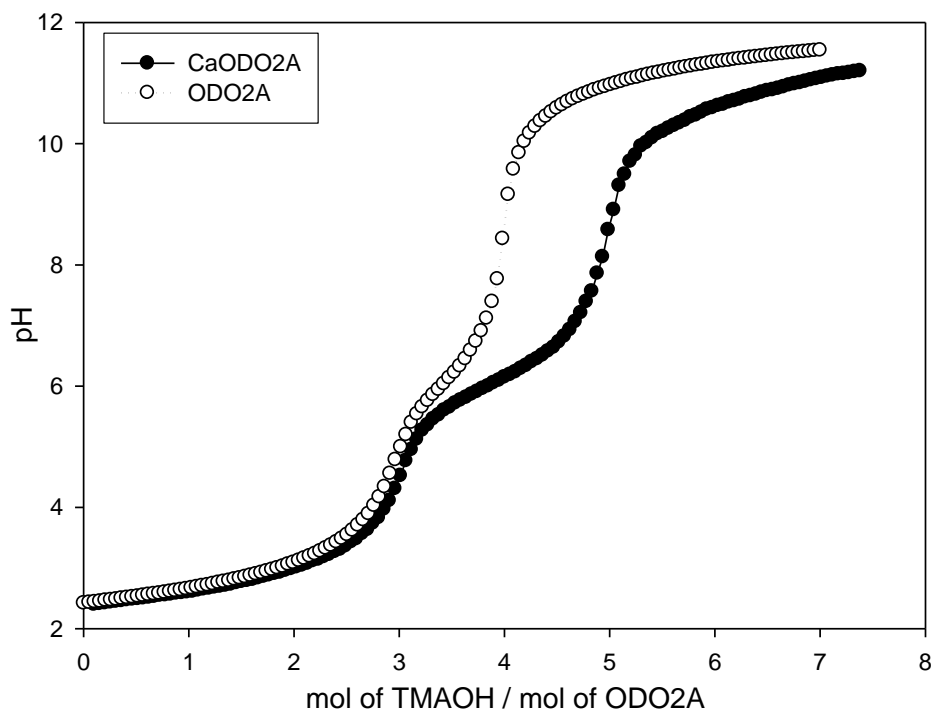


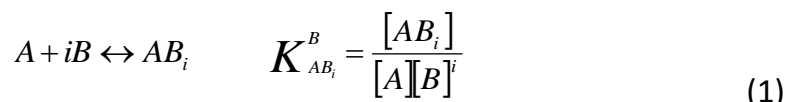
圖 4-1、ODO2A 與 CaODO2A 的滴定圖

將滴定 CaODO2A 的第二個反曲點減去滴定 ODO2A 的第二個反曲點，也就是五當量減去四當量，再乘以鹼液的濃度，及為較正確的 ODO2A 濃度。將此濃度乘以五減去滴定 CaODO2A 的第二個反曲點處所需的鹼毫莫耳數，即為不足的鹽酸毫莫耳數。因為再結晶時不一定會有剛好三當量的鹽酸一起結進去，透過這裡計算出來的實際鹽酸當量常為 2.7~3.0 左右，也與元素分析的結果有一致性。

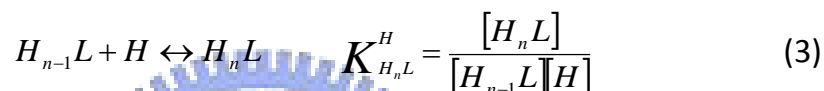
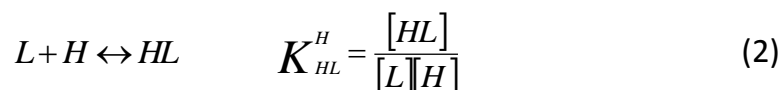
III. 配位子質子化常數之研究

A. 質子化常數計算原理³²

化學反應中，當中心離子 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，而形成物種 $AB_i (i = 1, 2, 3, \dots)$ 。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：



因 $K_{H_iL}^H (i = 1, 2, 3, \dots, n)$ 為每一步的質子化常數 (stepwise protonation constant)，而 $K_{H_nL}^H$ 為總質子化常數 (overall protonation constant)，其關係式為：

$$K_{H_nL}^H = K_{HL}^H \times K_{H_2L}^H \times K_{H_3L}^H \times \dots \times K_{H_nL}^H \quad (4)$$

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

$$\begin{aligned} h &= \frac{(\text{total dissocial hydrogen ion concentration bound to ligand species})}{(\text{total ligand concentration})} \\ &= \frac{[HL] + 2[H_2L] + 3[H_3L] + \dots + n[H_nL]}{[L] + [HL] + [H_2L] + \dots + [H_nL]} \\ &= \frac{\sum_{i=1}^n i[H_iL]}{\sum_{i=0}^n [H_iL]} = \frac{\sum_{i=1}^n iK_{H_iL}^H [H]^i}{\sum_{i=0}^n K_{H_iL}^H [H]^i} \quad \text{where } K_{H_0L}^H = 1 \end{aligned} \quad (5)$$

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，因此在溶液中的質量平衡式為：

$$[H]_t = \sum i[H_iL] + [H^+] - [OH^-] \quad (6)$$

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

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

$[OH^-]$ ：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，持續將強鹼加入溶液中，所以氫離子的總濃度會下降，此時 $[H]_t$ 也可以寫成：

$$[H]_t = \frac{n[L]_t - b}{V} \quad (7)$$

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

$[L]_t$ ：配位子總濃度(total ligand concentration)

$[H]_t$ ：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：

$$\sum i[H_iL] = [H]_t - [H^+] + [OH^-] = \frac{n[L]_t - b}{V} - [H^+] + [OH^-] \quad (8)$$

將式(8)除上配位子總濃度後，得到平均質子數 h ：

$$h_{\text{experimental}} = \frac{[H]_t - [H^+] + [OH^-]}{[L]_t} = \frac{\frac{n[L]_t - b}{V} - [H^+] + [OH^-]}{[L]_t} \quad (9)$$

若取 half-integral a 值(mole of base / mole of ligand)為 $K_{H_nL}^H$ 值，代入

$$\text{式(5)便可以得到 } h_{\text{theoretical}} = \frac{\sum_{i=1}^n i[H_iL]}{\sum_{i=0}^n [H_iL]}, \text{ 且與實驗值所得到的 } h_{\text{theoretical}}$$

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 $K_{H_nL}^H$ (質子化常數)。

B. 質子化常數的計算

使用的計算軟體是 1988 年 A. E. Martell 發表的 PKAS 程式³²。將 ODO2A 與 TMAOH 的酸鹼滴定資料輸出，用 MS Excel 處理成 PKAS 所需要的格式去運算。因為 ODO2A 經過與金屬的滴定後確定有五個質子可以解離，所以我們取的點必須包含五個當量的資料，即為滴定的鹼液體積與 pH 值。再輸入鹼液與配位子溶液的濃度，以及鹽酸量的修正，即可得到配位子的質子化常數 (LogK_i)。

C. ODO2A 質子化常數

	ODO2A	DO2A ³³	DO3A ³³	DOTA ³³	NO2A ²⁵	ODO2A ²⁷
LogK ₁	10.88±0.02	10.94	10.72	11.34	10.31	11.24
LogK ₂	5.96±0.11	9.55	9.51	9.90	6.61	6.02
LogK ₃	2.85±0.13	3.85	4.40	4.60	3.36	2.94
LogK ₄	-	2.55	3.39	4.00	-	1.4

表 4-1、各種配位子質子化常數

前人以 NMR 滴定所推測的 LogK₁ 要比我們所作的高²⁷，這也許是因為 ODO2A 的質子化順序時，在 K₁ 及 K₂ 之間時，加在二級氮上的質子會部分解離到三級氮上，以至於滴定曲線沒辦法準確的反應出來。而從 NMR 滴定圖來看即使到 pD 接近零，氮原子似乎還沒有完全加上質子，所以雖然 ODO2A 理論上有五個氮質子可以解離，但

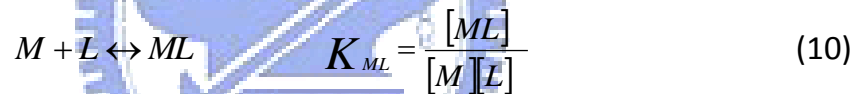
是由於內部的氮原子互相影響造成質子化順序並不單純，也因此我們以軟體計算出來的質子化常數，與其 NMR 滴定所推測的有差別。

而 $\text{Log}K_2$ 比 DO2A 低主要是因為另一個二級氮被氧所取代，所以 $\text{Log}K_2$ 是在其中一個三級氮上，並且伴隨著部分二級氮的氫解離。而整體的鹼度比 DO2A 低，反應到金屬錯合穩定常數應該也會稍微降低。另外 $\text{Log}K_4$ 及 $\text{Log}K_5$ 的數值為 1.86 及 1.24，基本上不可信，因為滴定的 pH 值並沒有涵蓋到如此低的數值。

IV. 配位子與金屬離子穩定常數之研究

A. 穩定常數計算原理³²

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} ：金屬離子錯合物的穩定常數(stability constant)

K_{MHL}^H ：金屬離子錯合物的質子化常數

$\text{Log}K_{MHL}^H$ 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 $\text{Log}K_{MHL}^H$ 。 $\text{Log}K_{MHL}^H$ 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： $[L]_t$ ：配位子總濃度(total ligand concentration)、 K_n ：配位子質

子化常數(protonation constant)

$$\begin{aligned}
[L]_t &= [L] + [HL] + [H_2L] + \cdots + [H_nL] + [MHL] + [ML] \\
&= (1 + K_1[H] + K_1K_2[H]^2 + \cdots + K_1K_2K_3 \cdots K_n[H]^n) [L] + (K_{MHL}^H[H] + 1) [ML] \\
&= A_1[L] + X_1[ML]
\end{aligned} \tag{12}$$

令， $A_1 = (1 + K_1[H] + K_1K_2[H]^2 + K_1K_2K_3[H]^3 + \cdots + K_1K_2K_3 \cdots K_n[H]^n)$

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

$[M]_t$ ：金屬離子總濃度(total metal ion concentration)

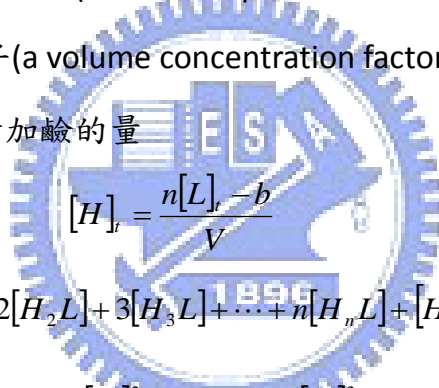
$$[M]_t = [ML] + [MHL] + [M] = [ML]X_1 + [M] \tag{13}$$

$[H]_t$ ：溶液中氫離子總濃度(total hydrogen ion concentration in the solution)

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

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

b ：滴定過程中所加鹼的量



$$[H]_t = \frac{n[L]_t - b}{V} \tag{14}$$

$$= [HL] + 2[H_2L] + 3[H_3L] + \cdots + n[H_nL] + [H^+] - [OH^-]$$

$$= [L](K_1[H] + 2K_1K_2[H]^2 + 3K_1K_2K_3[H]^3 + \cdots + nK_1K_2K_3 \cdots K_n[H]^n) + n[ML] + (n-1)[MHL] - [OH^-]$$

$$= [L](K_1[H] + 2K_1K_2[H]^2 + 3K_1K_2K_3[H]^3 + \cdots + nK_1K_2K_3 \cdots K_n[H]^n) + [ML][n + (n-1)K_{MHL}^H] - [OH^-]$$

$$= A_2[L] + X_2[ML] - [OH^-] \tag{15}$$

令， $A_2 = (K_1[H] + 2K_1K_2[H]^2 + 3K_1K_2K_3[H]^3 + \cdots + nK_1K_2K_3 \cdots K_n[H]^n)$

$$X_2 = n + (n-1)K_{MHL}^H$$

$[L]_t$ 、 $[M]_t$ 、 $[H]_t$ 、 A_1 、 X_1 、 A_2 、 X_2 、 $[OH^-]$ 為已知可求得之參數，故

K_{ML} (穩定常數)可由上列式(10)~(15)求得。

B. 穩定常數的計算

使用的軟體為 1988 年 A. E. Martell 發表的 BEST 程式³²。將 ODO2A 與金屬陽離子滴定的結果輸出(圖 4-2)，以 MS Excel 處理成 BEST 所需要的格式去運算。ODO2A 與金屬的滴定過程到了反曲點時為配位子與金屬完全錯合，質子全數釋放出來。所以運算所取的資料為滴定開始到反曲點為止。配合鹼液、配位子溶液及金屬離子溶液的濃度，以及鹽酸量的修正去計算，得到配位子與金屬離子的穩定常數 ($\text{Log}K_{\text{ML}}$)。反曲點的部分應為五個當量，而我們將 5.5 當量的 pH 值視為該鑰系金屬錯合物的水解常數($\text{p}K_{\text{h}}$)。

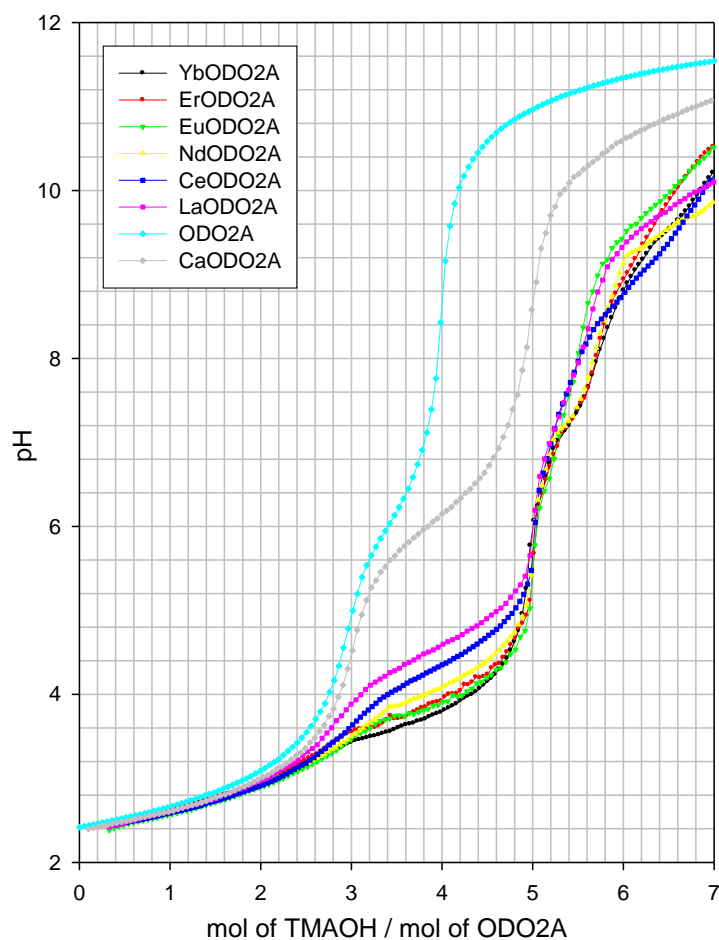


圖 4-2、一些鑰系金屬大環錯合物的滴定圖

C. ODO2A 與鑷系金屬的錯合穩定常數

LogK _{ML}	ODO2A	DO2A ³³	NO2A ²⁵	Ionic radii, ³⁴ Å
La ³⁺	10.76 ± 0.02	10.94 ± 0.14	8.95 ± 0.08	1.160
Ce ³⁺	11.21 ± 0.07	11.31 ± 0.03	9.63 ± 0.08	1.143
Pr ³⁺	11.66 ± 0.11	12.00 ± 0.10	10.18 ± 0.05	1.126
Nd ³⁺	11.77 ± 0.07	12.56 ± 0.10	10.39 ± 0.02	1.109
Sm ³⁺	12.20 ± 0.01	12.93 ± 0.01	10.87 ± 0.07	1.079
Eu ³⁺	12.25 ± 0.03	12.99 ± 0.12	10.84 ± 0.04	1.066
Gd ³⁺	11.81 ± 0.03	13.06 ± 0.04	10.74 ± 0.14	1.053
Tb ³⁺	12.13 ± 0.04	12.93 ± 0.01	10.82 ± 0.03	1.040
Dy ³⁺	12.01 ± 0.01	13.13 ± 0.05	10.84 ± 0.03	1.027
Ho ³⁺	11.98 ± 0.05	13.00 ± 0.01	10.89 ± 0.02	1.015
Er ³⁺	12.25 ± 0.01	13.31 ± 0.02	11.01 ± 0.02	1.004
Tm ³⁺	12.42 ± 0.03	13.19 ± 0.11	11.24 ± 0.04	0.994
Yb ³⁺	12.60 ± 0.08	13.26 ± 0.15	11.41 ± 0.09	0.985
Lu ³⁺	12.46 ± 0.02	13.16 ± 0.18	11.56 ± 0.01	0.977

表 4-2、鑷系金屬與各種配位子的錯合穩定常數

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，離子半徑減小，而與配位子的穩定常數就隨之增加(圖 4-3)，與其他大環配位子的結果相似。而整體來說 DO2A 還是有最高的穩定常數，再來才是 ODO2A，當初預測替換了一個氧原子可能會有比較高的穩定常數，但是實驗並未顯示此。也許是因為在計算質子化常數時得到較低的數據，總鹼度較低所造成的。但是其中可以確定的是 LnODO2A⁺ 仍然具有相當於 LnDO2A⁺ 的穩定，要比較小環穴的九元環 LnNO2A⁺ 還高。在這情況下 LnODO2A⁺ 可能會比 LnDO2A⁺ 多了一個配位水，對於切割效力的增加是可以期待的。

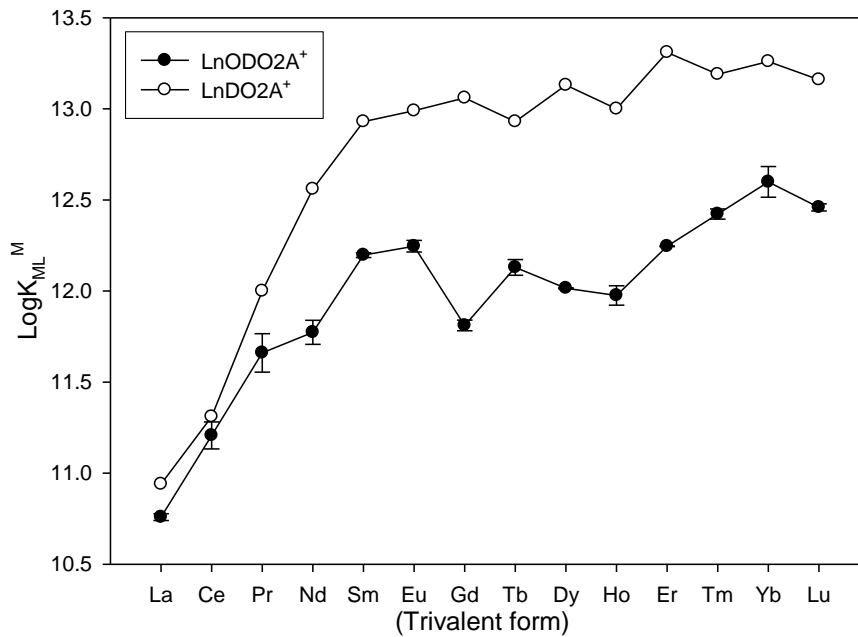


圖 4-3、不同鐳系金屬錯合物之穩定常數依原子序排列

D. ODO2A 與鐳系金屬的水解常數(pK_h)

LogK _h	ODO2A	DO2A ³³	NO2A ²⁶	Ln ³⁺³⁵
La ³⁺	7.87 ± 0.06	8.4 ± 0.2	9.51 ± 0.05	9.14
Ce ³⁺	8.21 ± 0.01		9.08 ± 0.04	
Pr ³⁺	7.74 ± 0.15		9.47 ± 0.09	8.63
Nd ³⁺	7.51 ± 0.08		9.83 ± 0.02	8.51
Sm ³⁺	7.63 ± 0.04		9.40 ± 0.06	8.42
Eu ³⁺	7.87 ± 0.21	8.4 ± 0.2	9.46 ± 0.03	8.39
Gd ³⁺	8.37 ± 0.19		9.37 ± 0.06	8.43
Tb ³⁺	7.29 ± 0.11		8.68 ± 0.16	8.24
Dy ³⁺	8.30 ± 0.26		8.64 ± 0.09	8.18
Ho ³⁺	7.41 ± 0.04		8.53 ± 0.07	8.12
Er ³⁺	7.41 ± 0.05		8.40 ± 0.10	8.07
Tm ³⁺	7.79 ± 0.17		8.54 ± 0.09	8.03
Yb ³⁺	7.39 ± 0.03	9.4 ± 0.3	8.50 ± 0.09	8
Lu ³⁺	7.32 ± 0.02		8.52 ± 0.15	7.98

表 4-3、鐳系金屬與各種配位子的水解常數

而在 pK_h 部分，看起來並沒有明顯的趨勢，而鑷系金屬離子本身大致上是隨原子序增加而降低(圖 4-4)。不過在動力學的實驗我們可以用水解速率常數來推測 pK_h ，再做進一步的討論。

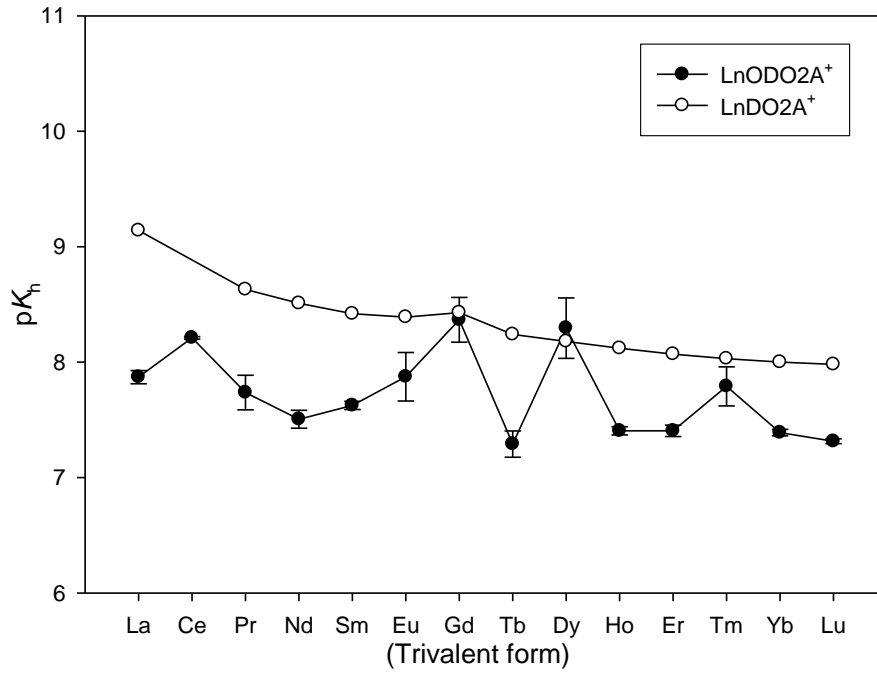


圖 4-4、 LnODO_2A^+ 與 Ln^{3+} 之水解常數與離子半徑關係

第五章、金屬離子錯合物之動力學研究

I. 實驗準備

A. 使用藥品

- 配位子 ODO2A
- 鑰系金屬 Ln series, >99.5%, Aldrich、Fluka
- Tetramethylammonium hydroxide ($(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$), ~10% in water, Fluka
- Tetramethylammonium chloride ($(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$), >98%, Merck
- Bis(p-nitrophenyl) phosphate sodium salt (BNPP), <0.05% free p-nitrophenol, Sigma
- MES、MPS、TAPS、CHES、CAPS、CABS, >98%, Sigma

B. 使用儀器

- Agilent HP 8453 UV-Visible spectrophotometer
- Agilent HP UV-Visible ChemStation Software

C. 溶液配製

1. 配位子 ODO2A、TMAOH、TMACl 以及 Ln^{3+} 溶液皆在上一段敘述過，配製到需要的濃度。

2. 配製 Bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP) 溶液

直接秤重配製成 20mM 的溶液，BNPP 反應性比較高，配製後分裝至小瓶分次取用，並還需存放在冰箱避光處理。

3. 配製 LnODO2A^+ 溶液

使用標定過的 Ln^{3+} 以及 ODO2A 溶液，以等當量的比例混合，但是 ODO2A 需輕微過量 2%~3%，這樣是確保具有活性的 Ln^{3+} 皆與 ODO2A 所錯合，而單獨的 ODO2A 是沒有水解活性的。依照實

驗需求計算最終的濃度為 16mM 或 4mM 來取用溶液，混合後攪拌並持續測量 pH 值，開始加入約 0.5M~1.1M 的 TMAOH。所需的鹼量為 LnODO_2A^+ 的五倍當量左右，也就是剛好能將解離出來的質子完全中和，加入過程需少量多次緩緩加入，像是滴定步驟一樣，等到 pH 值平衡後再滴入下一滴。從之前滴定的研究可以得知反曲點附近的 pH 值變化狀況，以此為參考，當 pH 到達當量點附近時，更須以極少量分次加入，必要時可以把鹼液加以稀釋，以免加入速度太快，使部分金屬錯合物(LaODO_2A^+ 、 CeODO_2A^+) 產生沉澱物。過程直到滴定到當量點 pH 為止，再依照實驗需求小心吸至定量瓶稀釋至 5ml 或 10ml，大約需要 1~2 天的時間。

4. 緩衝溶液的配製

MPS (3-Morpholinopropane sulfonic acid, $\text{p}K_a=7.2$)

TAPS (3-[Tris(hydroxymethyl)methylamino]-1-propanesulfonic acid, $\text{p}K_a=8.4$)

CHES (2-[N-Cyclohexylamino]-ethanesulfonic acid, $\text{p}K_a=9.3$)

CAPS (3-[Cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid, $\text{p}K_a=10.4$)

CABS (4-[Cyclohexylamino]-1-butanesulfonic acid, $\text{p}K_a=10.7$)。

根據 Henderson-Hasselbalch equation，配製成 200 mM，用 TMAOH 調整 pH 值為 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0 的緩衝液 20 ml。

II. 動力學研究

A. 實驗設計

1. CeODO2A⁺在 UV 光區有吸收值，藉此觀察不同 pH 值對於 CeODO2A⁺溶液中物種的變化。
2. LnODO2A⁺ (Ln = Eu、Yb)在不同 pH 值下水解 BNPP，監測 400nm 吸光值。
3. 選擇其中反應性好的 pH 值，讓不同濃度的 LnODO2A⁺水解 BNPP，監測 400nm 吸光值。

B. 實驗環境

LnODO2A⁺ 1~8mM、BNPP 0.1~0.3mM、 $\mu=0.1M$ 、

Buffer=75~100mM，總共 1~2ml。離子強度的計算需考慮金屬錯合物以及緩衝液所佔的比例，金屬錯合物的計算在滴定章節已經敘述過，這裡在加上緩衝液的離子強度為：

依照 Henderson-Hasselbalch 方程式 $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$

若是 pH9.0 的 CHES 緩衝液，則為

$$9.0 = 9.3 + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \rightarrow \quad \frac{[A^-]}{[HA]} = 0.501$$

則緩衝液產生的離子強度為

$$[\text{Buffer}] \times \frac{[A^-]}{([HA] + [A^-])} = 0.075M \times \frac{0.501}{1.501} = 0.00668M$$

所以要補足的離子強度為

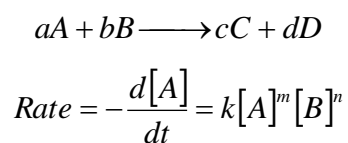
$$\mu = 0.1 - 0.00668 - 0.005(1mM \text{ ML 的離子強度}) = 0.0881M$$

換算成體積則為

$$\frac{0.0881M \times 1ml(\text{總體積})}{2M(\text{TMACl})} = 0.04405ml$$

C. 計算原理

反應速率(Rate)是以單位時間內反應物減少量或生成物增加量來表示，即為濃度變化對時間的關係。例如：



此反應式的反應速率對反應物 A 來說是 m 級(order)，對 B 來說是 n 級，則此反應之總級數為 m+n 級。m 與 n 是由實驗所決定，與係數 a、b 無關。而反應的初始速率(Initial Rate)則是取整體反應 5% 以內的部分來算速率。

而反應級數的推算方法，可以假設 LnODO2A⁺水解 BNPP 是一個簡單的不可逆反應，例如：



則速率 Rate 為

$$\text{Rate} = k[\text{LnODO2A}^+]^m[\text{BNPP}]^n$$

如果將 BNPP 的濃度固定，而去改變 LnODO2A⁺的濃度，則方程式可以換算成

$$\text{Rate} = k_{\text{obs}} [\text{BNPP}]^n$$

$$\text{其中 } k_{\text{obs}} = k[\text{LnODO2A}^+]^m$$

此時在不同濃度測量到的初始速率改變，就是 LnODO2A⁺濃度改變所造成的，進一步將方程式取對數

$$\log \text{Rate} = \log k_{\text{obs}} [\text{BNPP}]^n$$

$$\log \text{Rate} = \log k_{\text{obs}} + n \log[\text{BNPP}]$$

這樣速率與[BNPP]的對數關係就成為了直線，只要將實驗數據取對數並且畫出 xy 關係圖，就可以求得其漸進線的斜率，即為 BNPP 反應級數。LnODO2A⁺的反應級數也可依此求出。

而在我們的反應環境中，[LnODO2A⁺] 皆超過 [BNPP] 10 倍以上，

在上述的反應式內 $[\text{LnODO2A}^+]$ 就可以與 k 合起來視為 K_{obs} ，就是對 BNPP 的假一次反應(pseudo-first-order reaction)

III. 結果與討論

A. CeODO2A^+ 的動力學研究

1. CeODO2A^+ 的光譜吸收

在做 BNPP 切割之前，先利用 Ce^{3+} 在 UV 光區有吸收的性質，先觀察 CeODO2A^+ 本身是否有變化(圖 5-1)。 Ce^{3+} 在 252nm 與 298nm 有吸收峰值， CeODO2A^+ 則是在 261nm 與 294nm 左右有吸收峰值，比起 Ce^{3+} 的略有偏移。我們就以 294nm 的吸收峰值來觀察在不同 pH 值下的變化。另外因為此實驗須觀察 UV 光區，所以我們採用石英的比色管進行實驗。

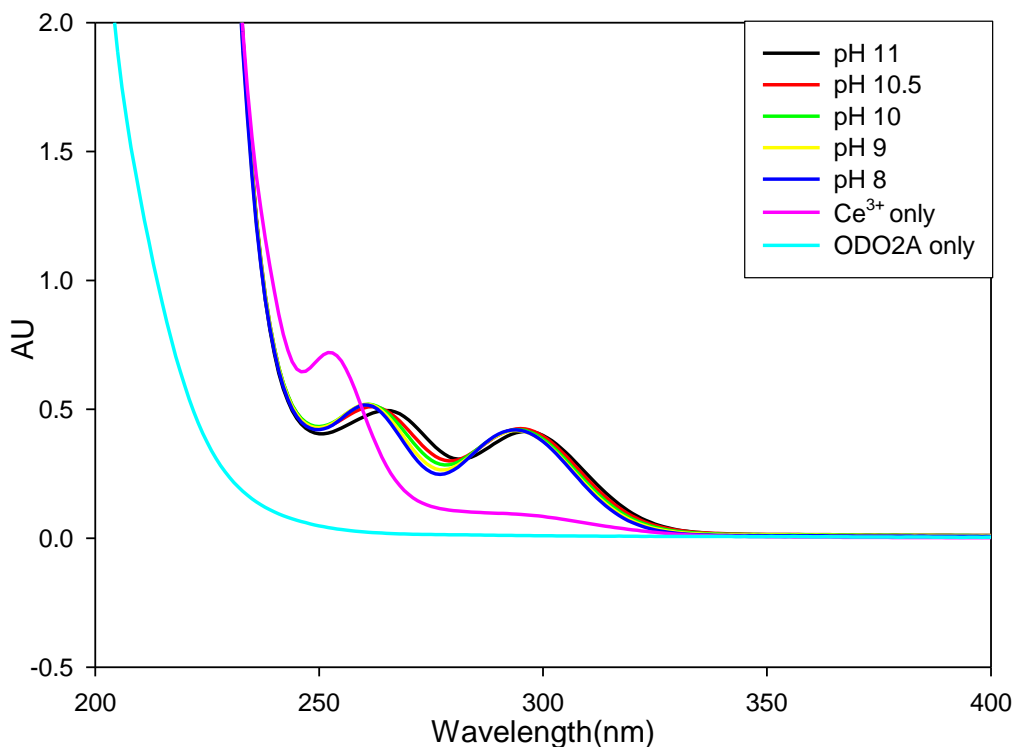


圖 5-1、 CeODO2A^+ 在 $T=0\text{s}$ 時的光譜圖。

$[\text{CeODO2A}^+]=1.0\text{ mM}$ ， $[\text{buffer}]=20\text{ mM}$ (TAPS pH 8.0；CHES pH 9.0；CAPS pH 10.0、pH 10.5；CABS pH 11.0)， $\mu=0.1\text{ M}$ ； $[\text{Ce}^{3+}]=1.0\text{mM}$ pH8.0； $[\text{ODO2A}]=1.0\text{ mM}$

2. 監測 CeODO2A^+ 在不同 pH 值下的 294nm 吸收值隨時間變化

不同的 pH 值會影響 CeODO2A^+ 在 294nm 的吸收值，持續監測 20000 秒可觀察到吸光值隨時間增長不斷上升(圖 5-2)。此外，隨 pH 值上升，294nm 的吸收值變化量也上升。

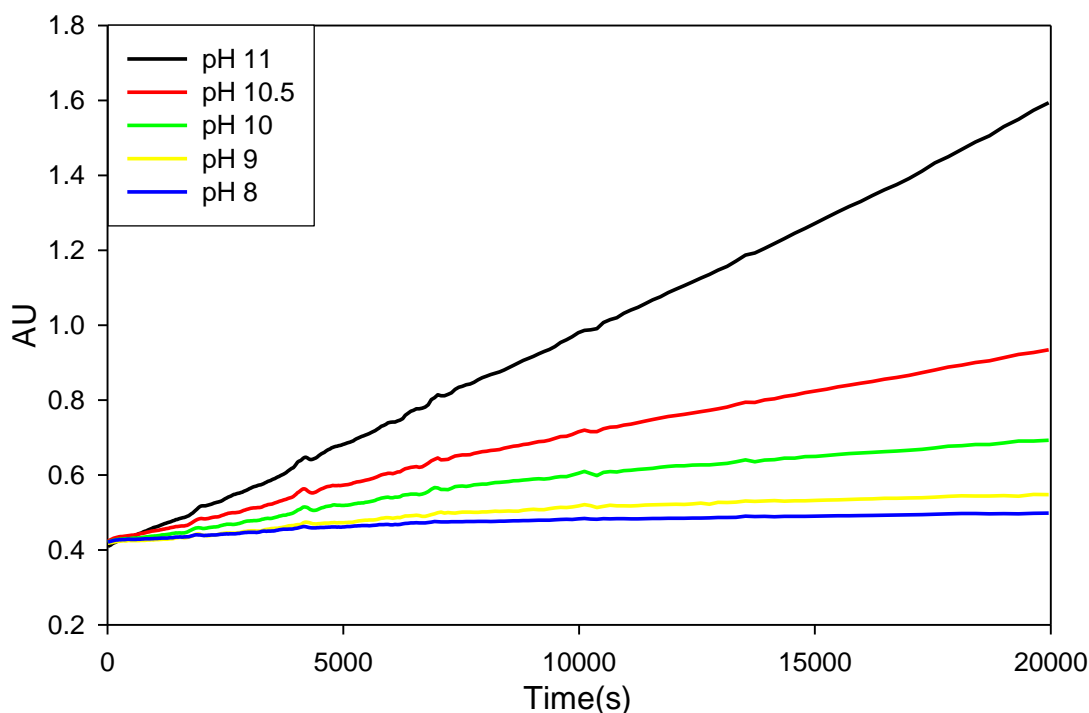


圖 5-2、不同 pH 值下 CeODO2A^+ 在 294nm 的吸收值與時間關係圖

$[\text{CeODO2A}^+]=1.0 \text{ mM}$ ， $[\text{buffer}]=20 \text{ mM}$

(TAPS pH 8.0；CHES pH 9.0；CAPS pH 10.0、pH 10.5；CABS pH 11.0)， $\mu=0.1 \text{ M}$

ODO2A 在這裡的結果與之前實驗室研究的 DO2A 的結果十分接近，在 294nm (DO2A 是在 291nm) 的吸收值上升的跡象穩定。而 NO2A、ONO2A 則是很快就產生吸收值降低的現象，尤其在高 pH 值的部分，吸光值上升的速度快，但是也很快就產生沉澱並且連帶吸光值一起下降。而 ODO2A 在經過 20000 秒的反應並無明顯沉澱產生。在這裡我們簡單的推測，在高 pH 值 ODO2A 與 DO2A 有相當的穩定程度，也比九元環系列的 NO2A、ONO2A 的穩定度要高。而依照其他配位子的推測，ODO2A 應該也是產生了多核物

種，但是形成沉澱的速度要比九元環要慢，在結構轉變的速度上比較慢。

而將前 1000 秒的數據用相對初始速率(Relative Initial Rate)去計算，並且取對數後對 pH 值作圖(圖 5-3)。

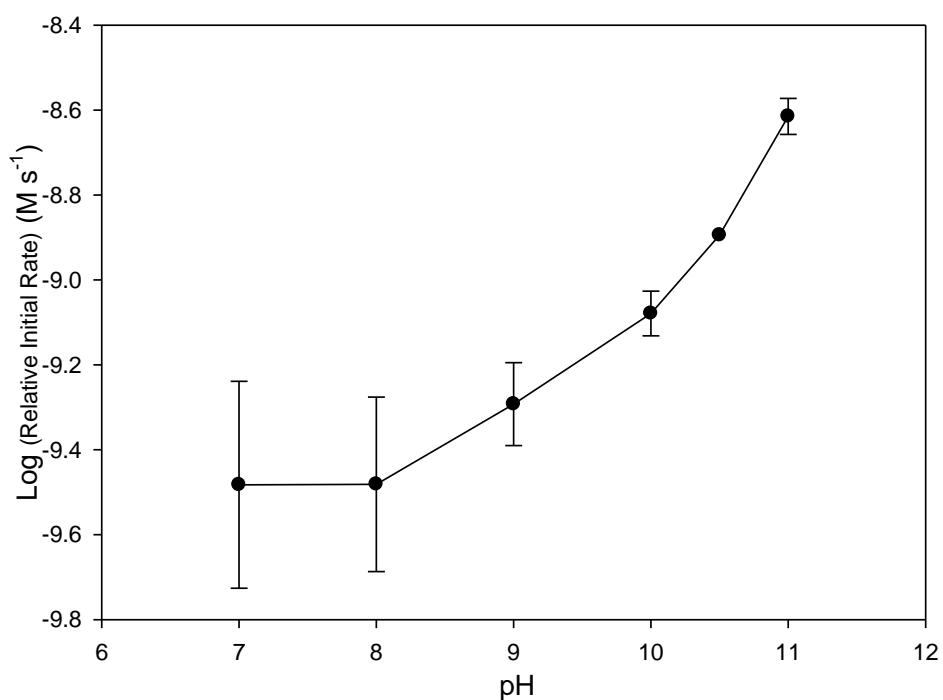


圖 5-3、CeODO2A⁺ 294nm 物種變化相對初始速率圖與 pH 值關係圖

[CeODO2A⁺]=1.0 mM，[buffer]=20 mM

(TAPS pH 8.0；CHES pH 9.0；CAPS pH 10.0、pH 10.5；CABS pH 11.0)， $\mu=0.1$ M

這是將反應推測為

$$\text{Rate} = k[\text{OH}^-]^x$$

取對數後

$$\log \text{Rate} = \log k + x \log[\text{OH}^-]$$

但是實驗結果並如此推測為直線，所以我們進行下一組實驗。

3. CeODO2A⁺在 pH 10.5 下的 294nm 吸收值隨時間變化的濃度效應

藉由改變 CeODO2A⁺的濃度，來看在 294nm 吸收的物種是否隨著濃度上升而產生速率上升(圖 5-4)。觀測 294nm 20000 秒的結果顯示，不同濃度的速率並無顯著不同。

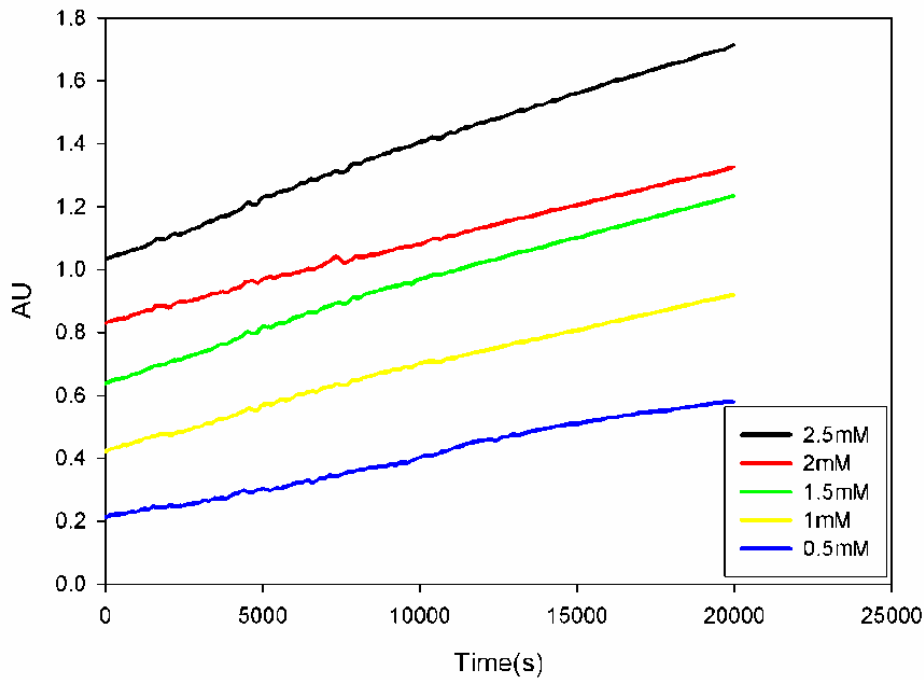


圖 5-4、不同濃度的 CeODO2A⁺在 pH10.5 時 294nm 吸收值與時間關係圖
[CeODO2A⁺]=0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mM，[buffer]=20 mM (CAPS pH 10.5)， $\mu=0.1$ M

若取前 300s 的數據來計算相對初始速率，並取對數與濃度對數作圖(圖 5-5)，可以套入這個公式

$$\text{Rate} = k[\text{CeODO2A}^+]^x \text{ 取對數}$$
$$\log \text{Rate} = \log k + x \log [\text{CeODO2A}^+]$$

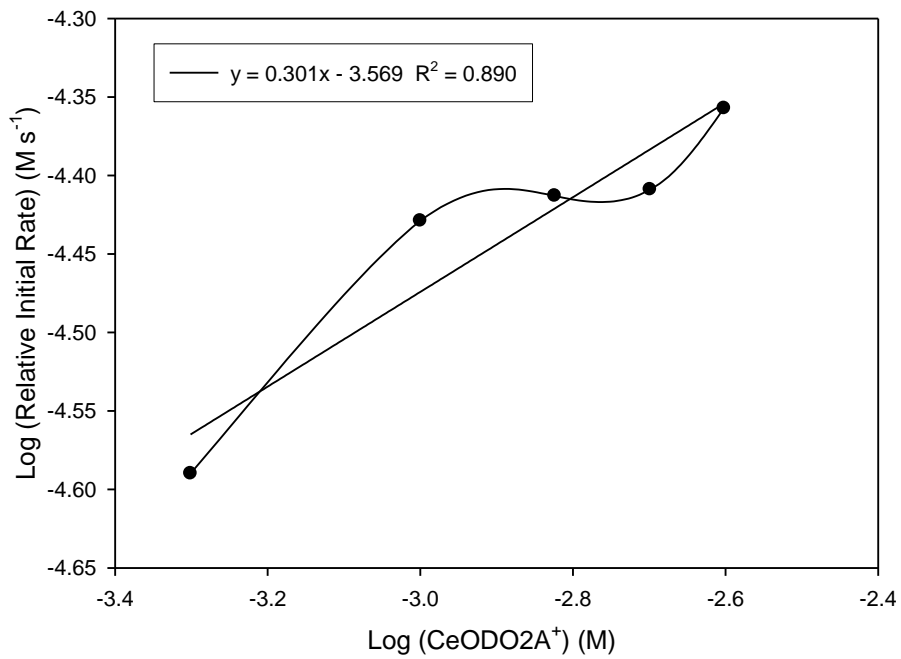


圖 5-5、CeODO2A⁺濃度與相對初始速率取對數關係圖

曲線雖有上升的趨勢，但是斜率只有 0.3，而且 1mM 到 2.5mM 這四點幾乎沒有差別，所以在這裡我們不認為 294nm 物種的生成與原來的 CeODO2A⁺濃度有直接關係。

B. LnODO2A⁺ (Ln = Eu, Yb) 水解 BNPP 反應在不同 pH 之效應

1. EuODO2A⁺ 水解 BNPP 反應在不同 pH 值之效應

我們選取了以 0.5 為間隔的 pH 值去進行反應，得到的吸光值隨時間的變化，取大約 600s 依照原理去計算反應初始速率。(圖 5-6)。

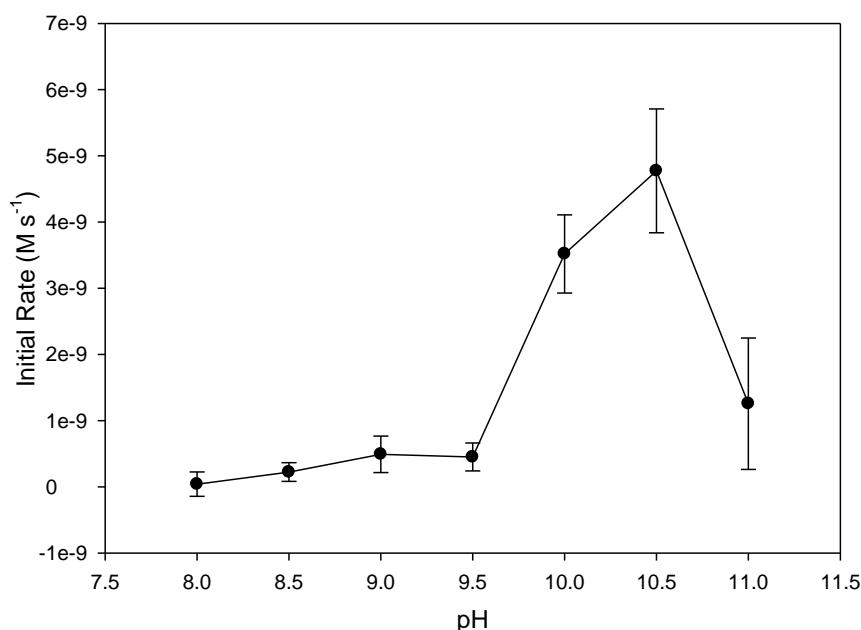


圖 5-6、EuODO2A⁺ 水解 BNPP 之初始速率與 pH 值關係圖

[EuODO2A⁺] = 1 mM, [BNPP] = 0.1 mM, [buffer] = 75 mM

(TAPS pH 8.0、pH 8.5; CHES pH 9.0、pH 9.5; CAPS pH 10.0、pH 10.5; CABS pH 11.0), $\mu=0.1$ M

EuODO2A⁺ 的趨勢與其他錯合物類似，到了 pH 10 速率開始有顯著增長。不過到了 pH 11 時急遽降低，這個結果與 EuNO2A⁺ 的情況比較類似。從這個圖導出的 pK_h 約在 9.5~10 之間。

而考量到此濃度條件下，切割比較緩慢，測量的數據較低，誤差稍大。我們將錯合物與 BNPP 濃度各增加兩倍，得到類似的關係圖。整體來說趨勢也是一樣，在 pH 10 左右速率就往上升，(圖 5-7)。

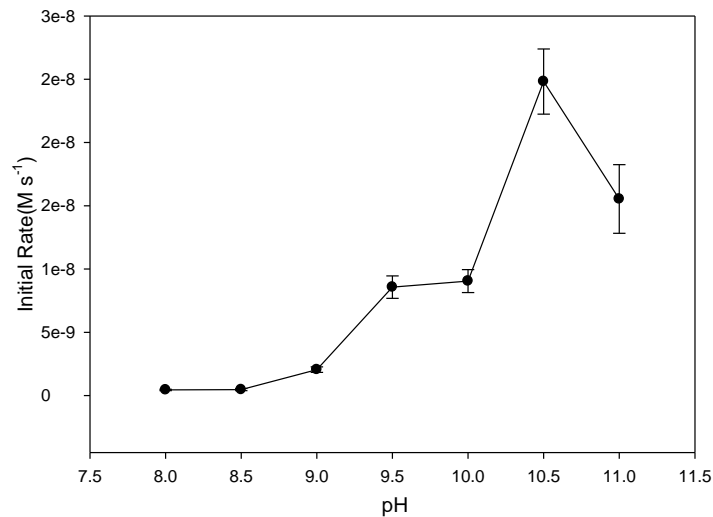


圖 5-7、較高濃度之 EuODO2A^+ 水解 BNPP 之初始速率與 pH 值關係圖

$[\text{EuODO2A}^+] = 2 \text{ mM}$, $[\text{BNPP}] = 0.2 \text{ mM}$ 、 $[\text{buffer}] = 100 \text{ mM}$

(TAPS pH 8.0、pH 8.5；CHES pH 9.0、pH 9.5；CAPS pH 10.0、pH 10.5；CABS pH 11.0)， $\mu = 0.1 \text{ M}$

我們將初始速率除以 BNPP 濃度即為假一次速率常數 k_{obs} ，將 k_{obs} 與對應之 pH 值的數據套入下列方程式並做圖 (圖 5-8)

$$\text{rate} = k_{\text{obs}} [\text{BNPP}] = k_{\text{LnL}(\text{OH})} [\text{LnL}(\text{OH})] [\text{BNPP}]$$

$$K_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{LnL}(\text{OH})} K_{\text{h}} [\text{LnL}]_{\text{t}}}{K_{\text{h}} + [\text{H}^+]}$$

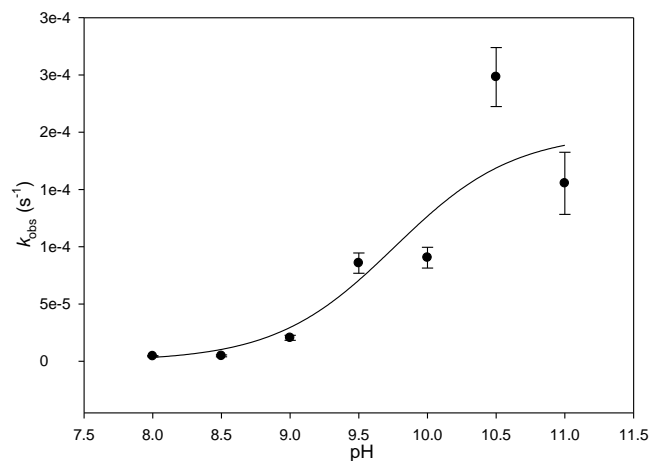


圖 5-8、 EuODO2A^+ 水解 BNPP 之 k_{obs} 與 pH 值關係圖

經過軟體計算後，我們得到 $\text{p}K_{\text{h}}$ 為 9.8、 $k_{\text{LnL}(\text{OH})}$ 為 0.05，因為 pH 11 水解速率已經下降，所以我們去除 pH 11 數據再計算一次(圖 5-9)。

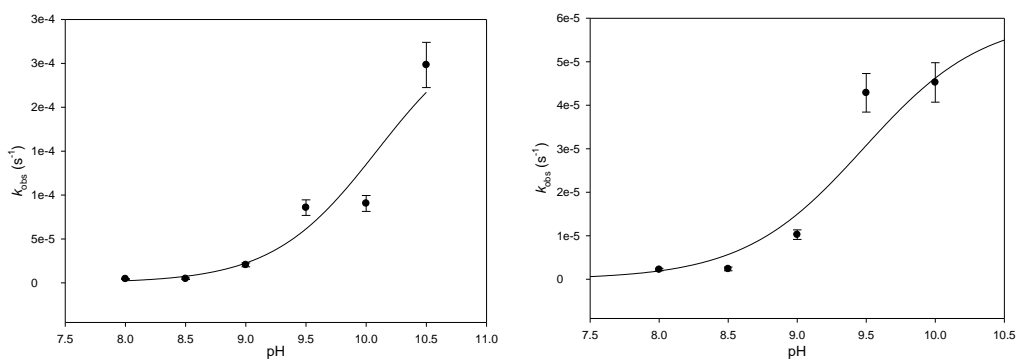


圖 5-9、EuODO2A⁺水解 BNPP 之 k_{obs} 與 pH 值關係圖
(去除 pH11(左圖)及 pH 10.5(右圖)之數據)

得到 pK_h 為 10.10、 $k_{LnL(OH)}$ 為 0.76。而再去除 pH 10.5 的結果是 pK_h 為 9.5、 $k_{LnL(OH)}$ 為 0.06。由兩組結果看來基本上 pK_h 大概在 9 點多，而這與從滴定資料來推測的 pK_h 為 7.87 相差了許多。從 DO2A 的經驗看來，DO2A 在 pH 10 左右也有一個很明顯的跳躍，但是 DO2A 在 pH 8 的時候就可以觀察到一個明顯的小跳躍，所以在 2005 發表的時候是取 pH 6.3~8.74 的數據去套用方程式，得到 pK_h 為 8.4。所以在 ODO2A 的狀況也許可以在 pH8~9.5 這階段多增加幾個點，或許可以看到更仔細的趨勢。

另外，pH 10.5 的 k_{obs} 為 0.0003 左右，與 EuDO2A⁺ 相當。雖然 EuDO2A⁺ 在 pH11 時水解速率並沒有降低，不過這裡可以觀察到 EuODO2A⁺ 也同樣具有優秀的水解能力。

2. YbODO2A⁺水解 BNPP 反應在不同 pH 值之效應

選用同樣的 pH 值去切割 BNPP。得到吸光值隨時間變化，取大約 600s 依照原理去計算反應初始速率(圖 5-10)。

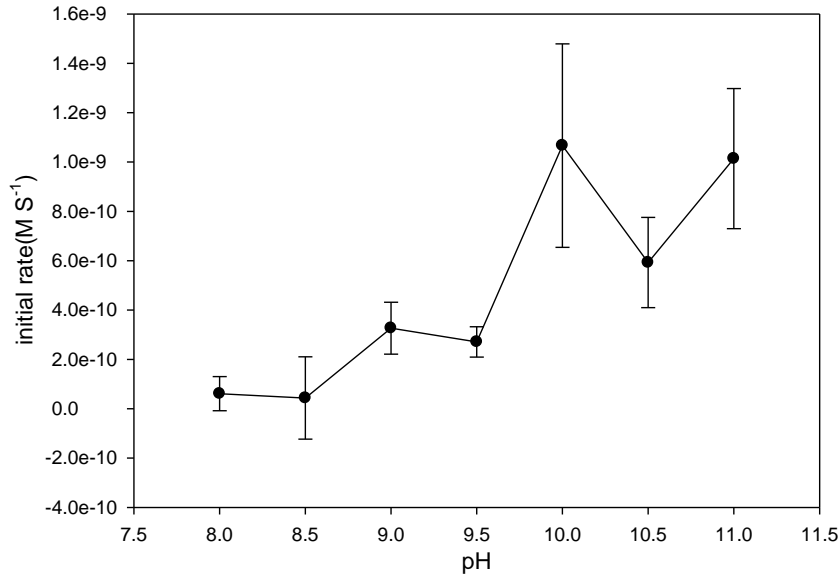


圖 5-10、YbODO2A⁺水解 BNPP 之初始速率與 pH 值關係圖

[YbODO2A⁺] = 1 mM, [BNPP] = 0.1 mM、[buffer] = 75 mM

(TAPS pH 8.0、pH 8.5；CHES pH 9.0、pH 9.5；CAPS pH 10.0、pH 10.5；CABS pH 11.0)， $\mu=0.1$ M

圖中 pH10 以上的實驗的誤差較大，這主要是因為在此條件下 YbODO2A⁺的切割速率更低，以至於 600s 以內時吸收值最高不過 0.01~0.02，其餘速率慢的滴 pH 值更低，機器的測量誤差影響就蠻大的。在這裡我們將錯合物及 BNPP 濃度皆提高三倍，假設反應級數都為一，速率就可提升九倍，吸光值應該可以到 0.1 左右，曲線會穩定許多(圖 5-11)。

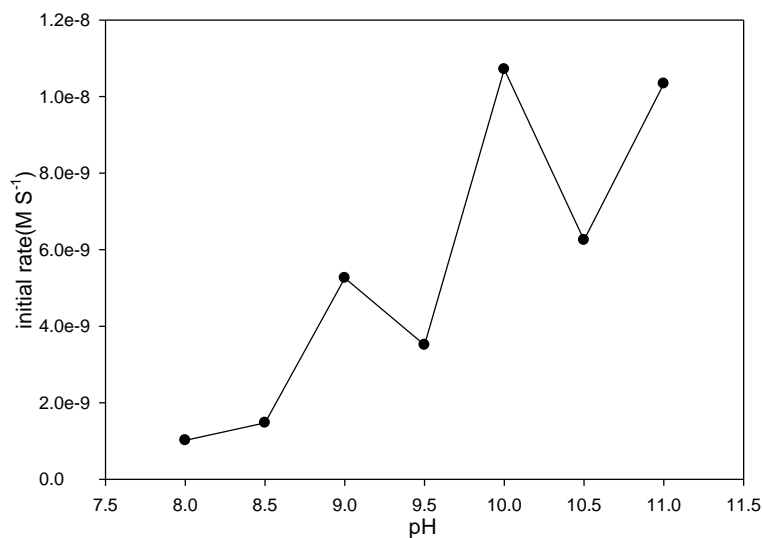


圖 5-11、較高濃度 YbODO2A⁺ 水解 BNPP 之初始速率與 pH 值關係圖

[YbODO2A⁺] = 3 mM, [BNPP] = 0.3mM、[buffer] = 100 mM

(TAPS pH 8.0、pH 8.5；CHES pH 9.0、pH 9.5；CAPS pH 10.0、pH 10.5；CABS pH 11.0)， $\mu=0.1$ M

將濃度提高後，速率大約增加了 9~10 倍，若是 YbODO2A⁺ 級數為 1 左右的話，實驗結果還算與低濃度的一致。但是趨勢也是一樣。高 pH 值反應速率的提高是我們所預期的，不過 pH 10.5 這組速率突然下降的原因，一時無法解釋。

C. LnODO2A^+ ($\text{Ln} = \text{Eu}、\text{Yb}$) 在同 pH 值下水解 BNPP 反應，錯合物濃度變化效應

1. EuODO2A^+ 濃度效應

從 pH 效應實驗觀察到 EuODO2A^+ 在切割 BNPP 上效果要比 YbODO2A^+ 要來的優秀，本實驗室也在 DO2A、NO2A 上已經觀察到這種現象。在 EuODO2A^+ 的部分(圖 5-12)，我們選擇反應最快的 pH 10.5 來做水解反應。高濃度的反應十分快速，在約 2000 秒即達到反應平衡，不再繼續水解 BNPP。而隨著濃度降低，反應速率也下降，但是達到平衡的時間也越長，2mM 這組要到 4000 秒才逐漸緩和。

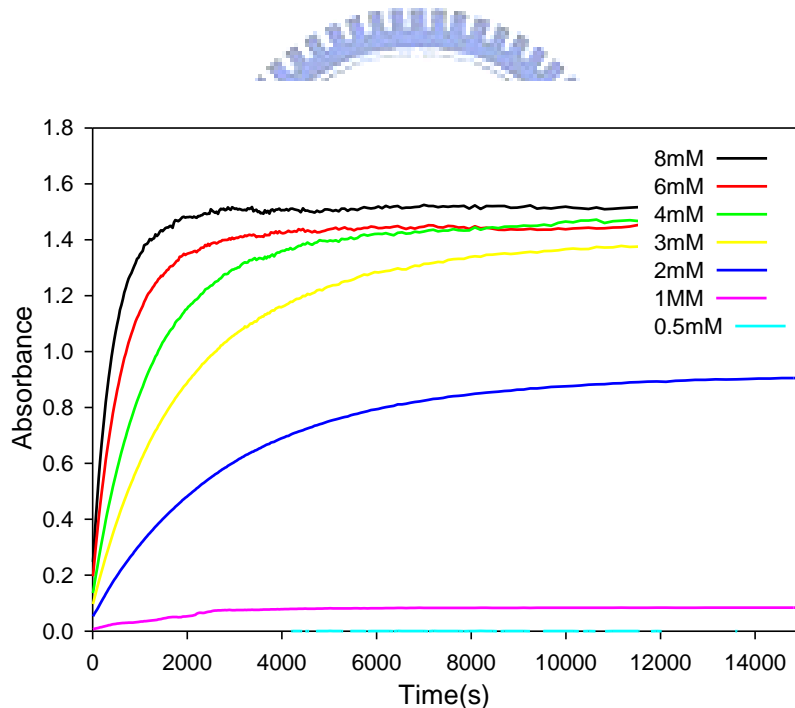


圖 5-12、不同濃度之 EuODO2A^+ 在 pH 10.5 時水解 BNPP 400nm 吸收值與時間關係圖

$[\text{EuODO2A}^+] = 1、2、3、4、6、8 \text{ mM}$ ， $[\text{BNPP}] = 0.1 \text{ mM}$

$\text{pH}=10.5$ $[\text{CAPS}] = 75 \text{ mM}$ ， $\mu=0.1 \text{ M}$

取前 300 秒的數據去計算初始速率，再取對數與濃度作圖(圖 5-13)。藉由套用到直線方程式可得到 EuODO2A^+ 反應級數為

1.83，超過 1 級不及 2 級，依照本實驗室的經驗，應該是由於有更具反應活性的雙體產生，所以造成反應級數大於 1。除此之外在高濃度的部分，速率增長有飽和的現象，有可能是因為在此濃度下，不具有活性或是較低活性的多核體的產生的比例要比更有活性的雙體多，所造成速率增加的飽和現象。另外一種推測就是 BNPP 被水解後產生的 NPP 與 Nitrophenol 也會回去與 EuODO2A^+ 結合，這樣會與剩下的 BNPP 產生競爭的效果，當 BNPP 濃度相對的低的時候，反應就趨緩了，因為 EuODO2A^+ 被產物阻擋而失去活性。

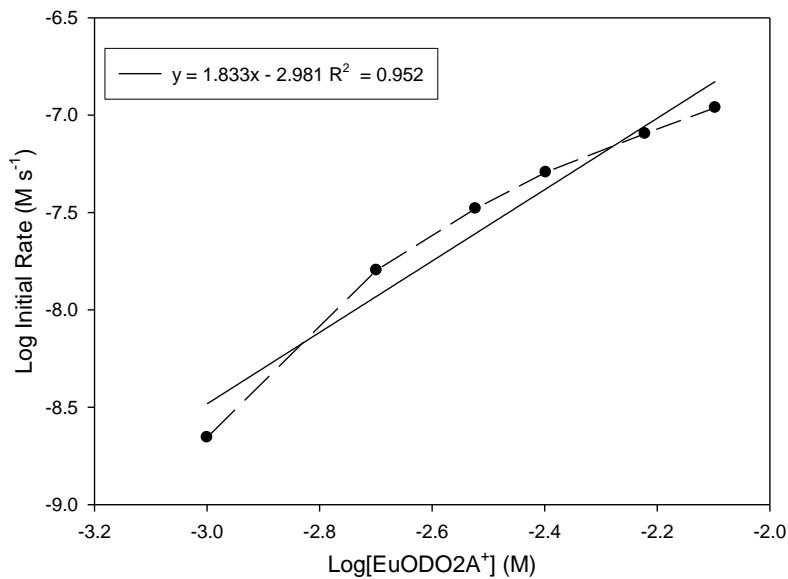


圖 5-13、 EuODO2A^+ 的級數，直線回歸斜率為 1.833

進一步將初始速率套到假一次速率常數式裡，把初始速率除以 [BNPP] 即為 K_{obs} ，再對 $[\text{EuODO2A}^+]$ 作圖(圖 5-14)。得到的關係圖近似直線，若用套用到直線方程式來看，是一斜率為 0.154 的直線。雖然實際反應應該更複雜，但從方程式來看應該不是直線，而是接近二次式的圖。

$$k_{\text{obs}} = k[\text{LnODO2A}^+]^x$$

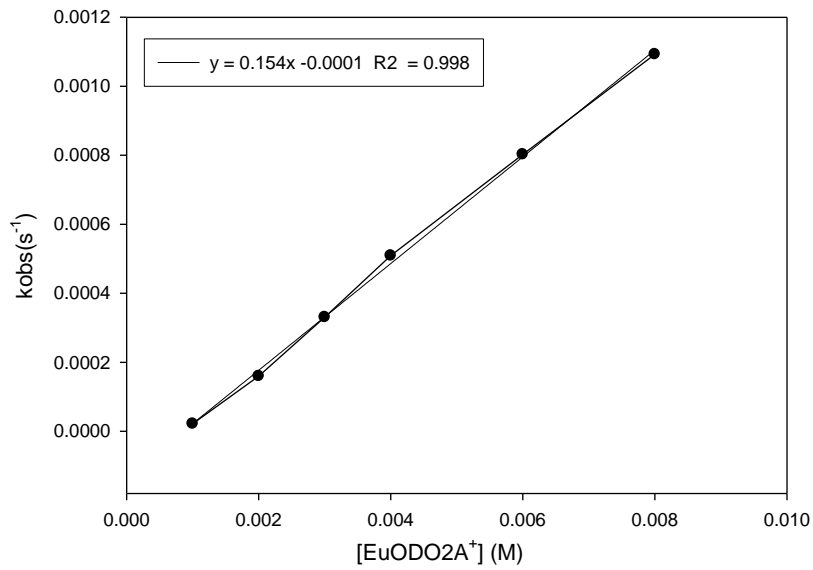
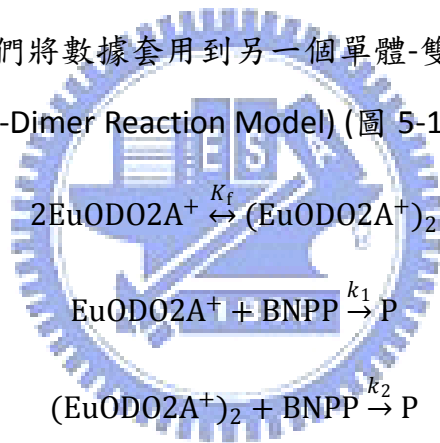


圖 5-14、EuODO2A⁺水解 BNPP 假一次速率常數與濃度關係圖

所以我們將數據套用到另一個單體-雙體反應動力學模型公式(Monomer-Dimer Reaction Model) (圖 5-15)



$$\text{Rate} = k_1[\text{EuODO2A}^+][\text{BNPP}] + k_2[(\text{EuODO2A}^+)_2][\text{BNPP}]$$

$$K_f = \frac{[(\text{EuODO2A}^+)_2]}{[\text{EuODO2A}^+]^2} \text{ 代入上式得到}$$

$$\text{Rate} = k_1[\text{EuODO2A}^+][\text{BNPP}] + k_2K_f[\text{EuODO2A}^+]^2[\text{BNPP}]$$

$$\text{而 } k_{\text{obs}} = k_1[\text{EuODO2A}^+]_{\text{T}} + k_2K_f[\text{EuODO2A}^+]_{\text{T}}^2$$

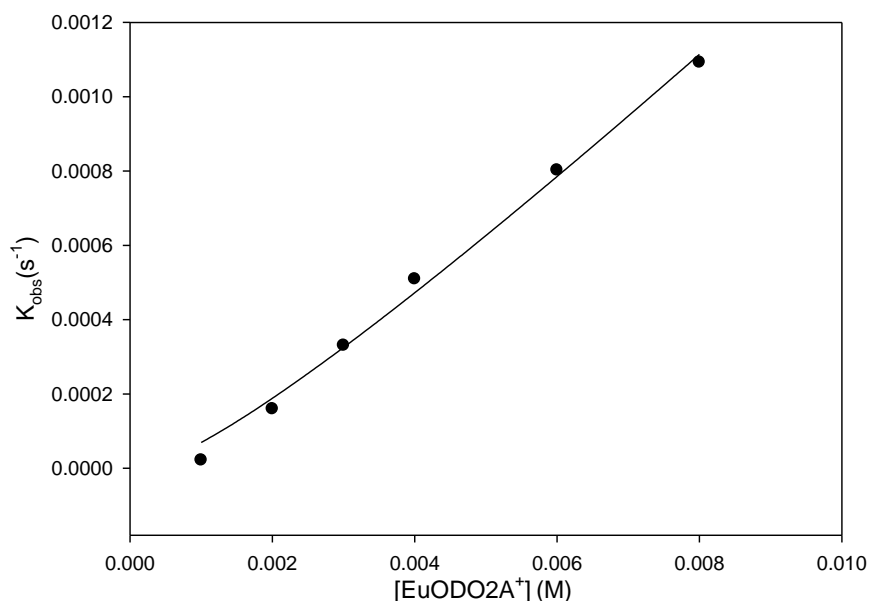
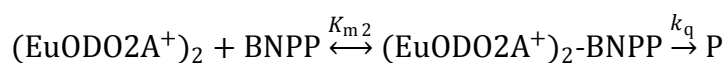
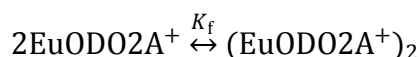
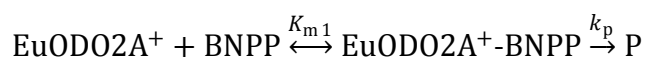


圖 5-15、將 EuODO2A^+ 之 K_{obs} 與濃度關係套入 Monomer-Dimer Reaction Model 所得的結果。

經由軟體計算後，我們得到 $k_1 = 1.214 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.4184 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $K_f = 372.29 \text{ M}^{-1}$ ($R^2 = 0.9977$)。從這數據看來，雙體的反應性要比單體好上很多，而且雙體的比例非常高。但是在 EuDO2A^+ 的狀況， K_f 只有 8.2 M^{-1} ，相較之下 EuODO2A^+ 形成雙體的傾向非常明顯，這也許是因為 ODO2A 在構型上比 DO2A 要有彈性所造成傾向於雙體構型，但是整體上來說速率還是稍低於 EuDO2A^+ 。

我們討論另一個動力學模型，將單體與雙體跟 BNPP 結合的能力考慮進去，套到單體-雙體平衡與受質平衡動力學模型(圖 5-16) (Monomer-Dimer Equilibrium and Complex-Substrate pre-Equilibrium Model)。



$$\text{Rate} = k_p [\text{EuODO2A}^+ \text{-BNPP}] + k_q [(\text{EuODO2A}^+)_2 \text{-BNPP}]$$

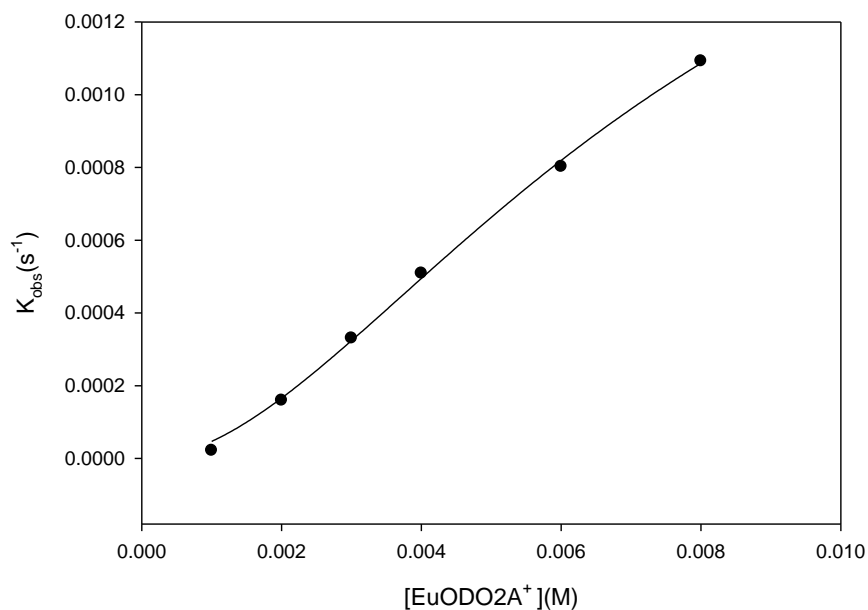


圖 5-16、將 EuODO2A⁺之 K_{obs} 及濃度關係套入 Monomer-Dimer Equilibrium and Complex-Substrate pre-Equilibrium Model 所得的結果。

經過軟體計算的結果，得到單體雙體與 BNPP 結合常數 $K_{m1} = 33.39 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_{m2} = 1761.12 \text{ M}^{-1}$ ，以及錯合中間物之一次速率常數 $k_p = 7.99 \times 10^{-12} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_q = 2.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ，最後雙體形成常數為 $K_f = 12.29 \text{ M}^{-1}$ ， $R^2 = 0.9994$ 。從圖看起來，實驗數據比較適用此模型。而從數據來看，雖然與 BNPP 結合能力雙體要高些，但不會太高，不過速率常數就還是雙體要比單體高了 3×10^8 倍，與前一個模型算出的速率常數大約一樣 (3.45×10^8 倍)。在雙體形成常數上，就只有 12.29 M^{-1} ，比前個模型算出來的 372 M^{-1} 低很多，但是跟 EuDO2A⁺ 以此模型所算的雙體形成常數一樣 (12 M^{-1})，這可能代表 EuODO2A⁺ 形成雙體的趨勢仍然與 EuDO2A⁺ 近似，但是雙體的催化效率比單體好很多是肯定的。

2. YbODO2A⁺濃度效應

我們選擇反應最快的 pH 10，用不同濃度的 YbODO2A⁺水解 BNPP，持續觀察了 20000 秒，觀察到反應呈現一個漸漸飽和的情形，切割速率越來越低，8mM 這組到了 15000 秒已經漸成直線(圖 5-17)。

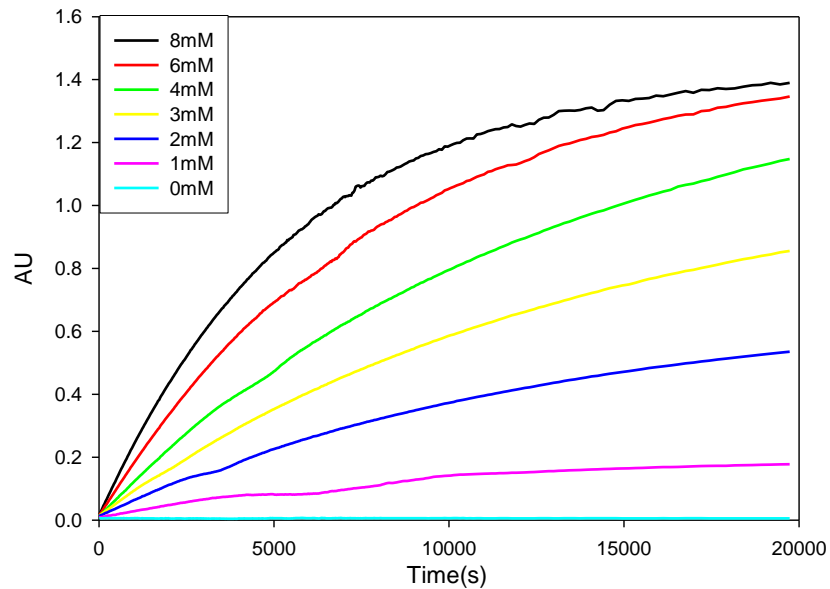


圖 5-17、不同濃度之 YbODO2A⁺在 pH 10 時
水解 BNPP 400nm 吸收值與時間關係圖

[YbODO2A⁺] = 1、2、3、4、6、8 mM，[BNPP] = 0.1 mM

pH=10 [CAPS] = 75 mM， $\mu=0.1$ M

取前 1000 秒的數據進行初始速率計算，並且取對數與濃度對數值作圖，得到級數為 1.16 的結果(圖 5-18)。

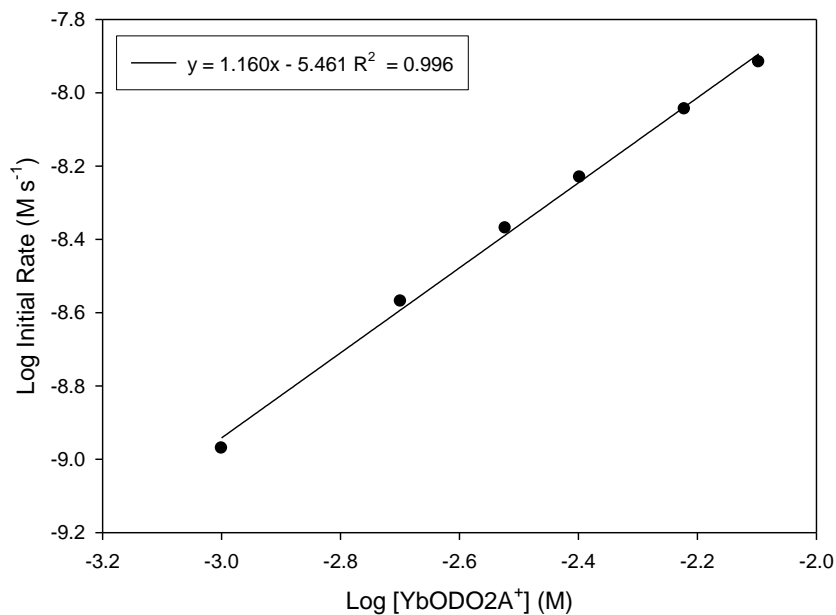


圖 5-18、YbODO2A⁺的級數，直線回歸斜率為 1.160

YbODO2A⁺的級數為 1.16，只略大於 1，這可能代表具有較強反應活性的雙體形成較少，或是雙體活性比較低。我們也將 YbODO2A⁺的數據套入單體-雙體反應動力學模型公式(圖 5-19) (Monomer-Dimer Reaction Model)

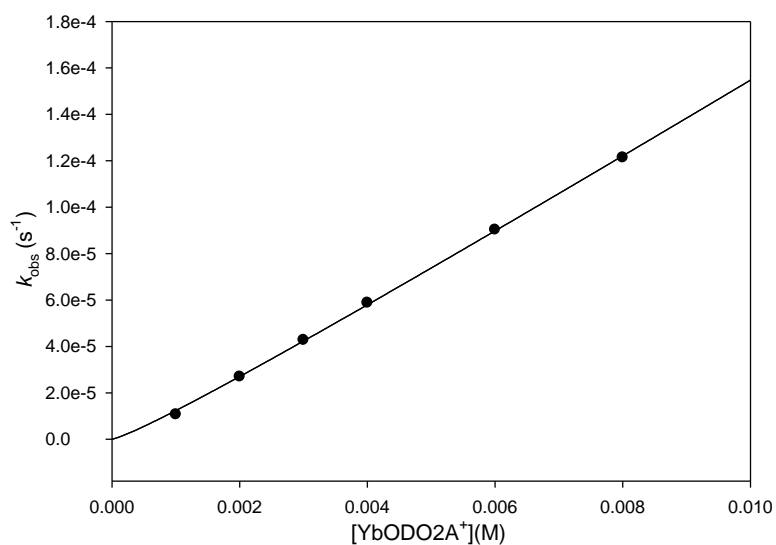


圖 5-19、將 YbODO2A⁺之 K_{obs} 與濃度關係套入 Monomer-Dimer Reaction Model 所得的結果。

經由軟體計算得到 $k_1 = 0.0068 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.035 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $K_f = 1146.42 \text{ M}^{-1}$ ($R^2=0.9998$)，雙體形成常數 K_f 非常高，但是速率常數只有增加五倍，與 EuODO2A^+ 的結果有所不同，可能是 YbODO2A^+ 形成的雙體活性提升的不多。

而我們同樣套用到另一個單體-雙體平衡與受質平衡動力學模型 (Monomer-Dimer Equilibrium and Complex-Substrate pre-Equilibrium Model)。

(圖 5-20)

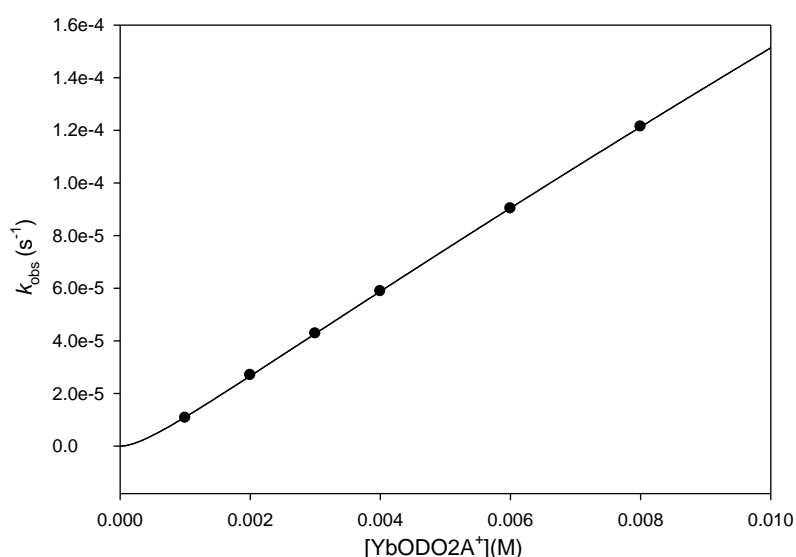


圖 5-20、將 YbODO2A^+ 之 K_{obs} 及濃度關係套入 Monomer-Dimer Equilibrium and Complex-Substrate pre-Equilibrium Model 所得的結果。

得到單體雙體與 BNPP 結合常數 $K_{m1} = 1789.13 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_{m2} = 84.25 \text{ M}^{-1}$ ，以及錯合中間物之一次速率常數 $k_p = 1.65 \times 10^{-14} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_q = 0.0811 \text{ s}^{-1}$ ，最後雙體形成常數為 $K_f = 4.57 \text{ M}^{-1}$ ， $R^2 = 0.99997$ 。這個結果比較矛盾，因為單體與 BNPP 的結合常數如此高，但反應速率又很低；而雙體的結合度低，但是反應速率又高。而雙體形成常數只有 4.5 M^{-1} ，這讓我們懷疑雙體的形成是否存在，而雙體的活性究竟是高還是低。

3. 不同錯合物之平衡常數與速率常數的比較

我們套用了兩種模型並得到相對應的平衡常數及速率常數，並製成表與 EuDO2A⁺來比較(表 5-1)。

Scheme 1 (Monomer-Dimer Reaction Model)			Scheme 2 (Monomer-Dimer Equilibrium and Complex-Substrate pre-Equilibrium Model)		
$2\text{LnL}^+ \xrightleftharpoons{K_f} (\text{LnL}^+)_2$ $\text{LnL}^+ + \text{BNPP} \xrightarrow{k_1} \text{P}$ $(\text{LnL}^+)_2 + \text{BNPP} \xrightarrow{k_2} \text{P}$			$\text{LnL}^+ + \text{BNPP} \xrightleftharpoons{K_{m1}} \text{LnL}^+-\text{BNPP} \xrightarrow{k_p} \text{P}$ $2\text{LnL}^+ \xrightleftharpoons{K_f} (\text{LnL}^+)_2$ $(\text{LnL}^+)_2 + \text{BNPP} \xrightleftharpoons{K_{m2}} (\text{LnL}^+)_2-\text{BNPP} \xrightarrow{k_q} \text{P}$		
EuODO2A ⁺	EuDO2A ⁺	EuNO2A ⁺	EuODO2A ⁺	EuDO2A ⁺	EuNO2A ⁺
pH 10.5	pH 9.35	pH 9.6	pH 10.5	pH 9.35	pH 9.6
$K_f=372.29\text{M}^{-1}$ $k_1=1.2\times 10^{-9}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_2=0.42\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$K_f=8.2\text{M}^{-1}$ $k_1=9.1\times 10^{-3}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_2=4.0\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$K_f=0.52\text{M}^{-1}$ $k_1=5.2\times 10^{-12}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_2=1.03\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$K_{m1}=33.39\text{M}^{-1}$ $k_p=7.99\times 10^{-12}\text{s}^{-1}$ $K_f=12.29\text{M}^{-1}$ $K_{m2}=1761.12\text{M}^{-1}$ $k_q=2.4\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$	$K_{m1}=2.9\text{M}^{-1}$ $k_p=3.1\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ $K_f=12\text{M}^{-1}$ $K_{m2}=120\text{M}^{-1}$ $k_q=2.3\times 10^{-2}\text{s}^{-1}$	$K_{m1}=76.46\text{M}^{-1}$ $k_p=6.9\times 10^{-13}\text{s}^{-1}$ $K_f=10.76\text{M}^{-1}$ $K_{m2}=15.06\text{M}^{-1}$ $k_q=7.26\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$

表 5-1、不同錯合物套入模型所得到的各個常數

從表格可以看到，EuODO2A⁺的部分，不論是 Model 1 或是 Model 2 所得到的結果，都顯示了雙體是反應的主要活性物質，單體的反應幾乎可以忽略，不過數據太小，不甚合理。而雙體形成常數在 Model 2 中三個錯合物得到的數值都差不多，不過 EuODO2A⁺反應的 pH 值比較高，此時形成的雙體才與 EuDO2A⁺相當，而速率略低。加上從反應的整體看來，EuODO2A⁺很快就停止反應，這其中可能還包含了除了高活性的雙體的形成以外的不具有活性之多體的產生，而這在 EuDO2A⁺並沒有見到。這大概也是 EuODO2A⁺在 pH 11 之後反應速率大幅下降的原因，可能是無活性

多體的快速產生，以至於高活性雙體實際反應的時間很少，這情形在 EuNO_2A^+ 也有見到。在 pH 效應的實驗中，pH 11 的反應在 1000s 就已經平衡不再繼續水解。需要更複雜的方程式來解釋。而我們也應該多增加幾組 pH 值來進行水解 BNPP 的反應，以便更清楚的觀察到更精確的 LnODO_2A^+ 各個 $\text{p}K_h$ 值。

而 YbODO_2A^+ 的部分，數值與實際情形不太符合， YbODO_2A^+ 在之前的研究認為，與十二元環錯合時，由於 Yb^{3+} 較小，錯合時比較深入環穴，容易造成只有形成兩個配位水的空間，若形成雙體則會失去活性。而在 YbODO_2A^+ 的情形， YbODO_2A^+ 可能也是有無活性雙體與高活性雙體的平衡，只是組成比例與 EuODO_2A^+ 有很大不同，傾向於無活性雙體。我們可以試著多用幾種介於 Eu^{3+} 以及 Yb^{3+} 的鑷系金屬，觀察是否有某種趨勢，以便理出其中的物質組成情形。



第六章、結論與未來展望

- I. 整體而言，總鹼度是 $\text{DO2A} > \text{ODO2A}$ ，而 $\text{p}K_{\text{h}}$ 也是 $\text{DO2A} > \text{ODO2A}$ ，穩定常數也是 $\text{DO2A} > \text{ODO2A}$ 。在動力學上， EuODO2A^+ 的雙體水解 BNPP 速率要比單體快，而整體速率比 EuDO2A^+ 慢。
- II. 設計一個優良的人工水解酶需要良好的配位子配合適當的金屬離子，理論上來說路易斯酸性越強的金屬切割效率越好，但是若與配位子錯合後的情況就會變得複雜。離子的大小與配位子的相關位置，會進而影響到配位水的數量。即便 LnODO2A^+ 與 LnDO2A^+ 一樣擁有 2~3 個配位水，但是在水溶液中形成雙體的趨勢就不同，而雙體的活性更是影響反應速率的極大因素，而更進一步形成的多體的低活性也是必須避免的。
- III. 鑰系金屬由於配位數高，在水溶液中的物種組成本來就比較複雜。在最近發表的鑰系金屬離子水解 BNPP 反應，利用加入簡單的負離子化合物 4-ICA(4-imidazolecarbocyclic) 來穩定鑰系金屬離子的雙體化³⁶。而未來我們也可以試著加入另外的穩定劑來抑制我們的大環錯合物多體的產生，而將平衡趨於雙體的產生。從這點來看，也許構型較具有彈性的 LnODO2A^+ 比起 LnDO2A^+ 有更快的速度來形成有活性的雙體。
- IV. 除了控制雙體的產生以外，我們也可試著自己合成雙體。目前本實驗室也進行了 DO2A 及 NO2A 的雙體合成，但是架橋的分子必須多加選擇，在 NO2A 的雙體合成中使用了帶有苯基的分子，希望能更將雙體結構穩固，但是近來研究發現會將鑰系金屬錯合穩定常數降低太多，所以必須選用其他的架橋分子。此外要能將金屬離子之間保持適當距離，讓配位水能夠互相幫忙穩定受質而不會自己結合讓活性降低，也是研究的重點。

- V. 在結構的研究上，我們也希望能夠將多體結構結晶出來，以證實我們的推論。而從結構上我們更能了解錯合物形成多體的關鍵處，並且對症下藥，以改進人工水解酶的效率。

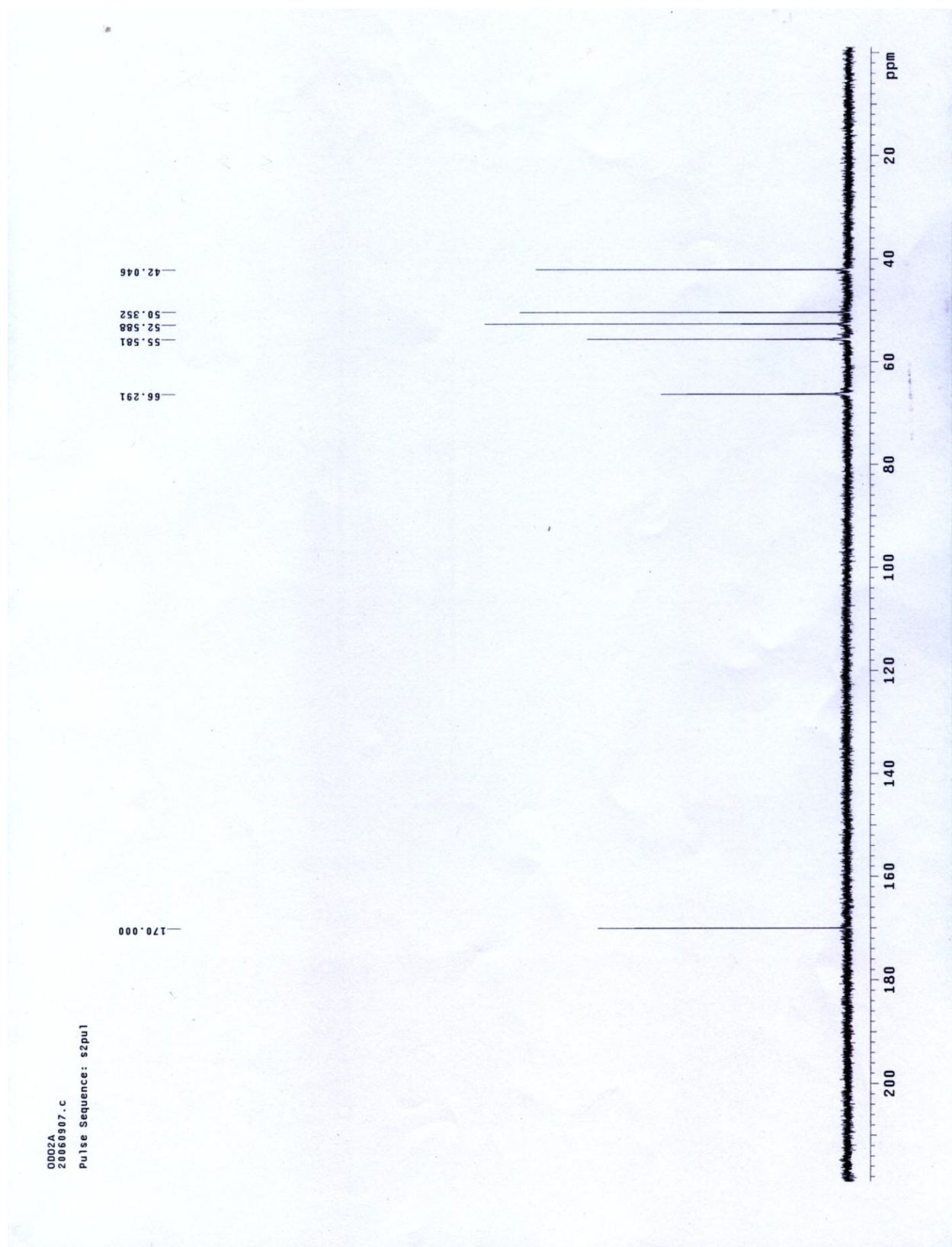


參考文獻：

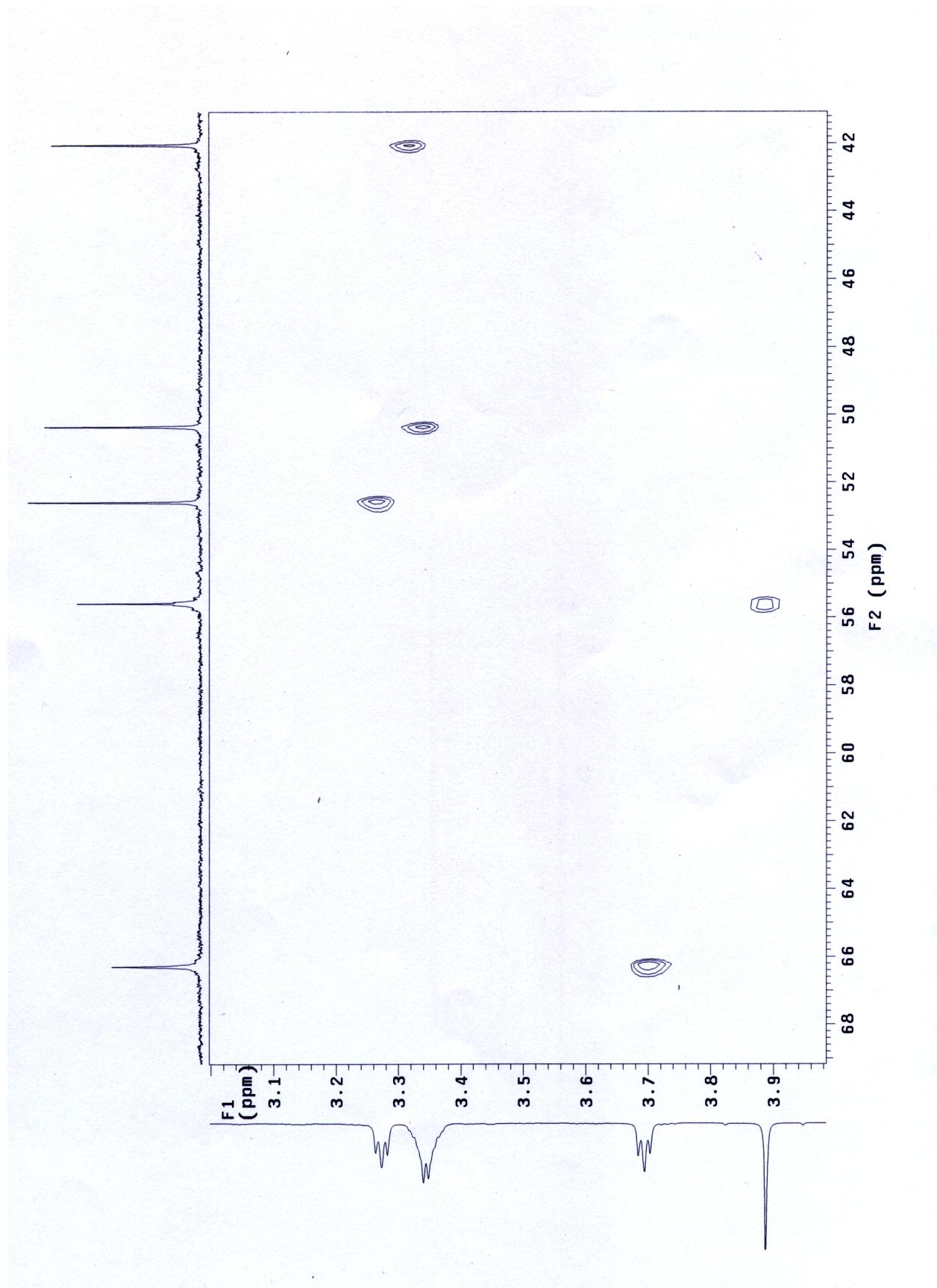
1. Kramer, R., *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, 182, 243-261.
2. Hegg, E. L.; Burstyn, J. N., *Coordination Chemistry Reviews* **1998**, 173, 133-165.
3. Gellman, S. H.; Petter, R.; Breslow, R., *Journal of the American Chemical Society* **1986**, 108, (9), 2388-2394.
4. Breslow, R.; Berger, D.; Huang, D. L., *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 112, (9), 3686-3687.
5. Kovari, E.; Kramer, R., *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, (50), 12704-12709.
6. Burstyn, J. N.; Deal, K. A., *Inorganic Chemistry* **1993**, 32, (17), 3585-3586.
7. Deal, K. A.; Burstyn, J. N., *Inorganic Chemistry* **1996**, 35, (10), 2792-2798.
8. McCue, K. P.; Voss, D. A.; Marks, C.; Morrow, J. R., *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1998**, (18), 2961-2963.
9. McCue, K. P.; Morrow, J. R., *Inorganic Chemistry* **1999**, 38, (26), 6136-6142.
10. Deal, K. A.; Park, G.; Shao, J.; Chasteen, N. D.; Brechbiel, M. W.; Planalp, R. P., *Inorganic Chemistry* **2001**, 40, (17), 4176-4182.
11. Hegg, E. L.; Mortimore, S. H.; Cheung, C. L.; Huyett, J. E.; Powell, D. R.; Burstyn, J. N., *Inorganic Chemistry* **1999**, 38, (12), 2961-2968.
12. Deck, K. M.; Tseng, T. A.; Burstyn, J. N., *Inorganic Chemistry* **2002**, 41, (4), 669-677.
13. Iranzo, O.; Elmer, T.; Richard, J. P.; Morrow, J. R., *Inorganic Chemistry* **2003**, 42, (24), 7737-7746.
14. Trawick, B. N.; Daniher, A. T.; Bashkin, J. K., *Chemical Reviews* **1998**, 98, (3), 939-960.
15. Butcher, W. W.; Westheimer, F. H., *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77, (9), 2420-2424.
16. Jebasingh, B.; Alexander, V., *Inorganic Chemistry* **2005**, 44, (25), 9434-9443.
17. Fenton, D. E.; Vigato, P. A., *Chemical Society Reviews* **1988**, 17, (1), 69-90.
18. Morrow, J. R.; Buttrey, L. A.; Shelton, V. M.; Berback, K. A., *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, (5), 1903-1905.
19. Morrow, J. R.; Buttrey, L. A.; Berback, K. A., *Inorganic Chemistry* **1992**, 31, (1), 16-20.
20. Amin, S.; Voss, D. A.; Horrocks, W. D.; Morrow, J. R., *Inorganic Chemistry*

- 1996**, 35, (26), 7466-&.
21. Baker, B. F.; Khalili, H.; Wei, N.; Morrow, J. R., *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, (38), 8749-8755.
 22. Gunnlaugsson, T.; Davies, R. J. H.; Kruger, P. E.; Jensen, P.; McCabe, T.; Mulready, S.; O'Brien, J. E.; Stevenson, C. S.; Fanning, A. M., *Tetrahedron Letters* **2005**, 46, (21), 3761-3766.
 23. Huskens, J.; Torres, D. A.; Kovacs, Z.; Andre, J. P.; Geraldes, C.; Sherry, A. D., *Inorganic Chemistry* **1997**, 36, (7), 1495-1503.
 24. Chang, C. A.; Wu, B. H.; Kuan, B. Y., *Inorganic Chemistry* **2005**, 44, (19), 6646-6654.
 25. Tsai, C. H., *Master Thesis* **2006**.
 26. Amorim, M. T. S.; Ascenso, J. R.; Delgado, R.; Dasilva, J., *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1990**, (11), 3449-3455.
 27. Amorim, M. T. S.; Chaves, S.; Delgado, R.; Dasilva, J., *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1991**, (11), 3065-3072.
 28. Rossiter, C. S.; Mathews, R. A.; Morrow, J. R., *Inorganic Chemistry* **2005**, 44, (25), 9397-9404.
 29. Lukyanenko, N. G.; Basok, S. S.; Filonova, L. K., *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1988**, (12), 3141-3147.
 30. Buhleier, E.; Rαβhofer, W.; Wehner, W.; Luppertz, F.; Vogtle, F., *Liebigs Annalen der Chemie* **1977**, 8, 1344-1346.
 31. Amorim, M. T. S.; Delgado, R.; Dasilva, J. J. R., *Polyhedron* **1992**, 11, (15), 1891-1899.
 32. Martell, A. E.; Motekaitis, R. J., *The Determination and Use of Stability Constants*. 1988.
 33. Chang, C. A.; Chen, Y. H.; Chen, H. Y.; Shieh, F. K., *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1998**, (19), 3243-3248.
 34. Chang, C. A.; Ochaya, V. O., *Inorganic Chemistry* **1986**, 25, (3), 355-358.
 35. Smith, R. M.; Martell, A. E., *Critical Stability Constants*. 1974-1989.
 36. Aguilar-Perez, F.; Gomez-Tagle, P.; Collado-Fregoso, E.; Yatsimirsky, A. K., *Inorganic Chemistry* **2006**, 45, (23), 9502-9517.

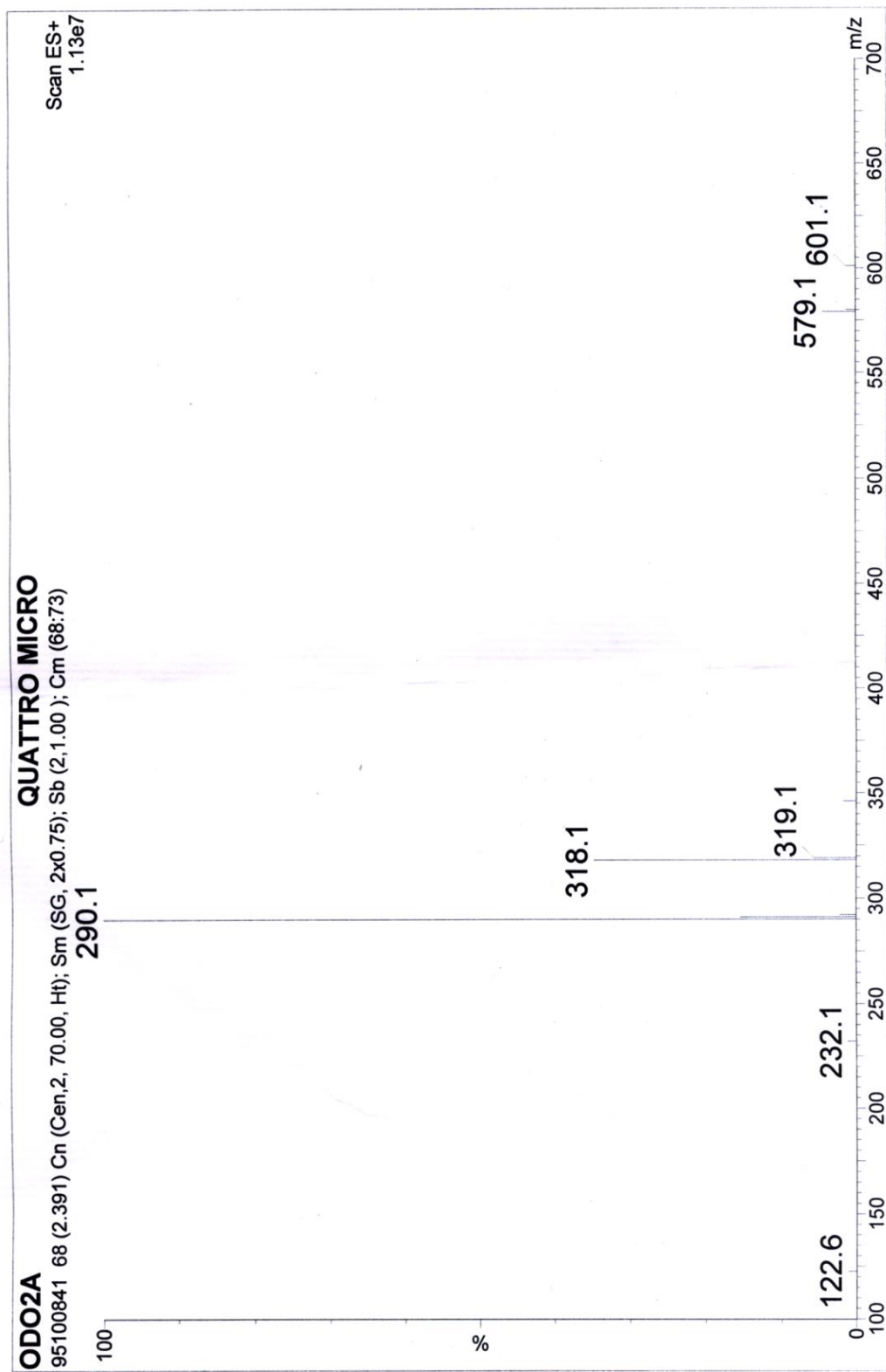
附錄一、NMR ^{13}C 圖譜



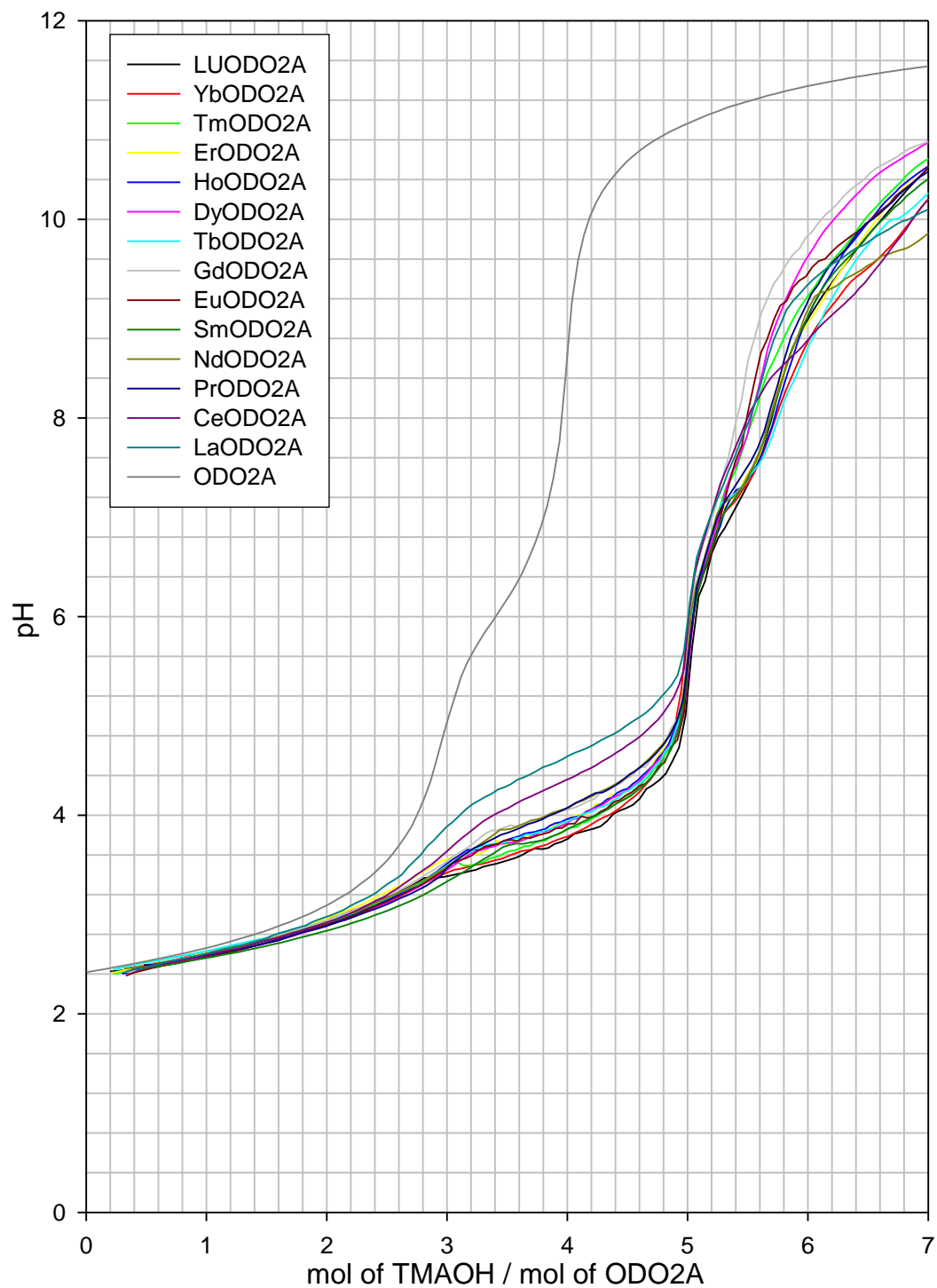
附錄二、2D-NMR gHETCOR 圖譜



附錄三、ESI⁺ MASS 圖譜

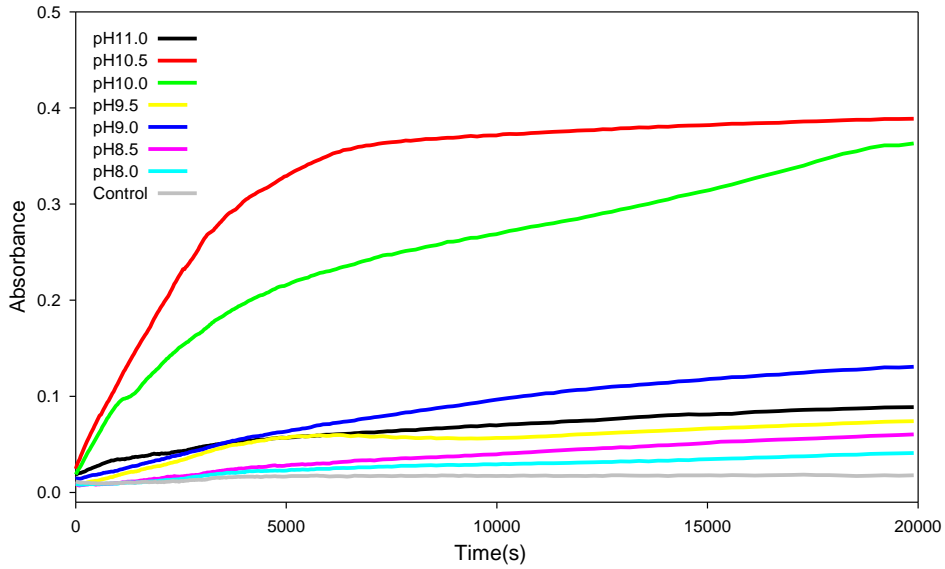


附錄四、LnODO2A⁺ 滴定曲線



附錄五、LnODO2A⁺水解 BNPP 之 pH 效應

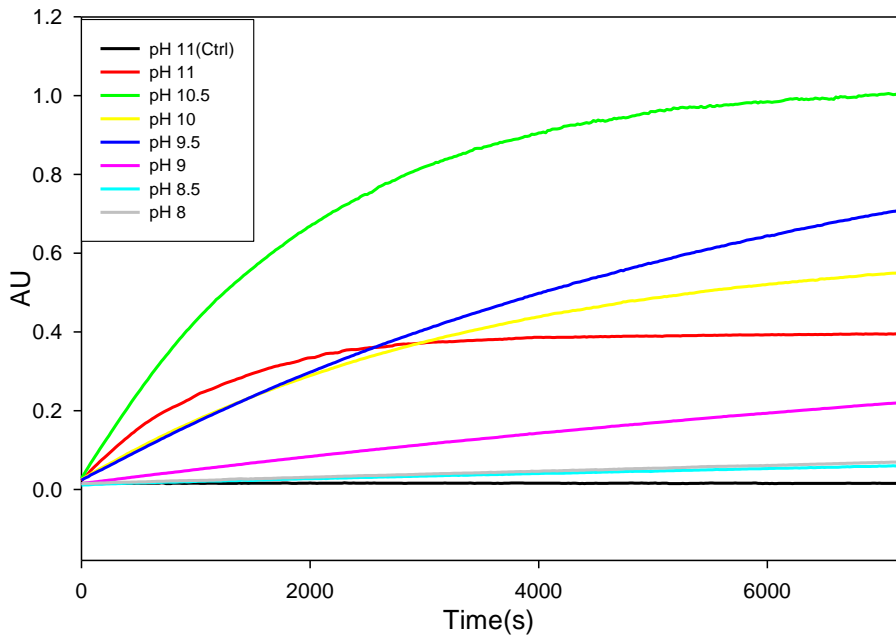
EuODO2A⁺水解 BNPP 之 pH 效應，400nm 吸收值與時間關係圖



[EuODO2A⁺] = 1 mM, [BNPP] = 0.1 mM、[buffer] = 75 mM

(TAPS pH 8.0、pH 8.5；CHES pH 9.0、pH 9.5；CAPS pH 10.0、pH 10.5；CABS pH 11.0)，μ=0.1 M

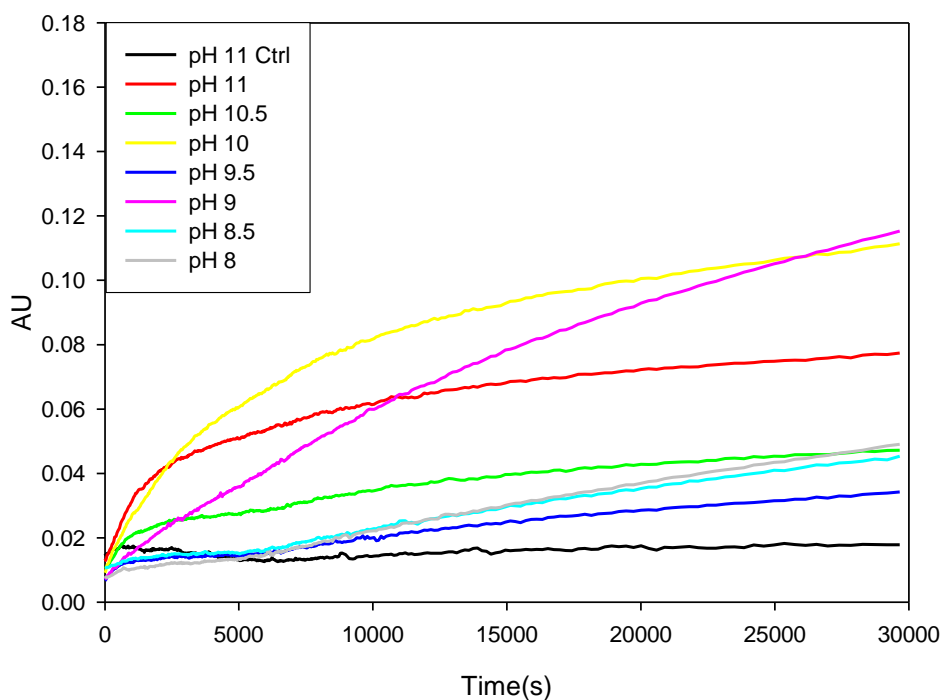
較高濃度 EuODO2A⁺水解 BNPP 之 pH 效應，400nm 吸收值與時間關係圖



[EuODO2A⁺] = 2 mM, [BNPP] = 0.2 mM、[buffer] = 75 mM

(TAPS pH 8.0、pH 8.5；CHES pH 9.0、pH 9.5；CAPS pH 10.0、pH 10.5；CABS pH 11.0)，μ=0.1 M

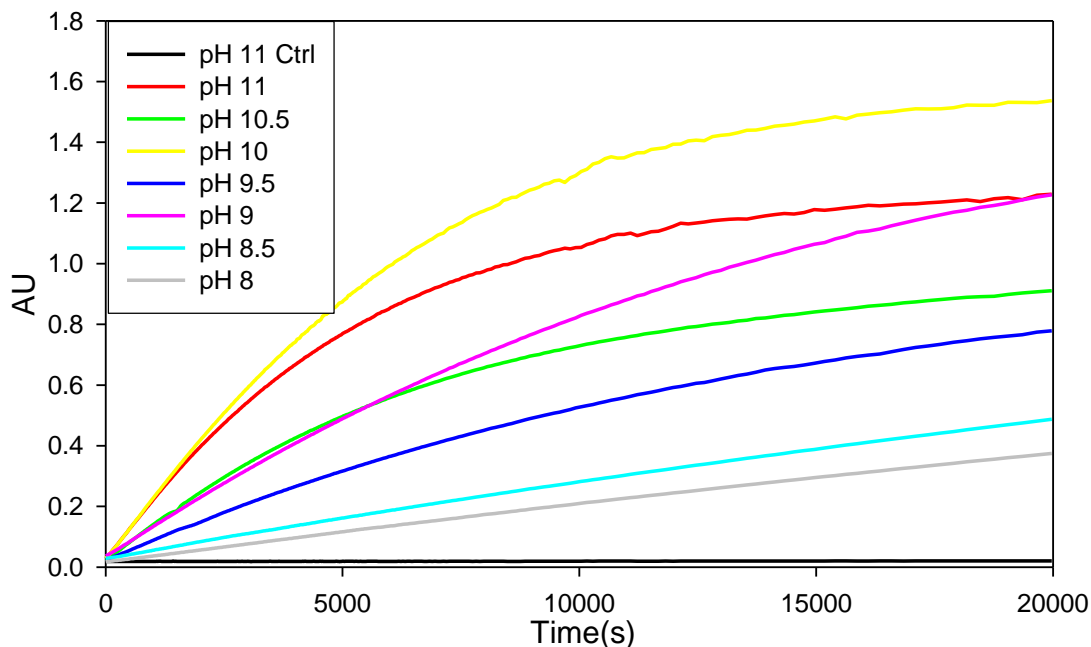
YbODO2A⁺水解 BNPP 之 pH 效應，400nm 吸收值與時間關係圖



[YbODO2A⁺] = 1 mM, [BNPP] = 0.1 mM, [buffer] = 75 mM

(TAPS pH 8.0、pH8.5; CHES pH 9.0、pH 9.5; CAPS pH 10.0、pH 10.5; CABS pH 11.0), $\mu=0.1$ M

較高濃度 YbODO2A⁺水解 BNPP 之 pH 效應，400nm 吸收值與時間關係圖



[YbODO2A⁺] = 3 mM, [BNPP] = 0.3 mM, [buffer] = 75 mM

(TAPS pH 8.0、pH8.5; CHES pH 9.0、pH 9.5; CAPS pH 10.0、pH 10.5; CABS pH 11.0), $\mu=0.1$ M