

國立交通大學

生物科技所

碩 士 論 文

大環配位子 DO2PA 之熱力學研究與 HEDTA 鑷
系金屬錯合物水解磷酸酯鍵之動力學研究



The Stability Constants of Lanthanide Complexes of
DO2PA and the Promotion of BNPP Hydrolysis by
Lanthanide Complexes of HEDTA

研究生：陳郁頻

指導教授：張 正 教授

中華民國九十六年七月

大環配位子 DO2PA 之熱力學研究與 HEDTA 鑷系金屬錯合物水解磷酸酯鍵之動力學研究

學生：陳郁頻

指導教授：張正 博士

國立交通大學生物科技學系（研究所）碩士班

摘要

鑷系金屬離子(Ln^{3+})與其金屬錯合物具有良好的路易士酸特性、高配位數與高電子密度與熱力學穩定度，且相關研究也已經證實其對於 DNA、RNA 與磷酸酯鍵的水解有效力，非常適合做為人造水解酶，因此合成設計一個能促進磷酸酯鍵水解的金屬錯合物，一直是我們實驗室很感興趣的領域。實驗室之前已成功的合成 LnDO_2A^+ 、 LnODO_2A^+ 、 LnNO_2A^+ 、 $\text{LnPhNO}_2\text{A}^+$ 、 LnONO_2A^+ ，且經由實驗證實其具有極高水解 BNPP 的效力，同時也了解錯合物配位水數目、位向及其電性對於水解磷酸酯鍵的影響。

在此，我們合成了 DO2PA(四氮十二元環二丙酸基)大環，並利用電位滴定法計算出其相關金屬錯合物的穩定常數，發現 DO2PA 的錯合效果不好，在取得足夠數據前就已經產生金屬氫氧化物沉澱。在 HEDTA 鑷系金屬錯合物水解磷酸酯鍵 pH 6.96.-10.89 的實驗中，我們發現反應速率大致隨著原子序的增加而減小，隨著 pH 值的增加而增加；另外，藉由改變 LnHEDTA 錯合物的濃度，同時將相關數據帶入簡單的飽和動力學反應機構，得到水解 BNPP 時的水解常數 k (first order rate constant)及 LnHEDTA-BNPP 的鍵結常數 K (LnHEDTA-BNPP binding constant)。

The Stability Constants of Lanthanide Complexes of DO2PA and the Promotion of BNPP Hydrolysis by Lanthanide Complexes of HEDTA

Student : Yu-Pin Chen

Adviser : Dr. C. Allen Chang

Department (Institute) of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

ABSTRACT

The cationic trivalent lanthanide (Ln^{3+}) ions and complexes have good Lewis acids ability, high thermodynamics stability, low kinetics lability, high coordination numbers, and charge density. It has been demonstrated to be effective DNA, RNA, and phosphodiester compounds' cleavage agents. So macrocyclic lanthanide complexes will be suitable as artificial nucleases. We have been interested in design and synthesis of macrocyclic lanthanide complexes which are capable of catalytically hydrolyzing phosphodiester bonds. Our lab had synthesized a few ligands LnDO2A^+ 、 LnODO2A^+ 、 LnNO2A^+ 、 LnPhNO2A^+ 、 LnONO2A^+ and verified they would promote effectively hydrolysis of BNPP by experiment. We also verified more coordinated water would make metal complexes more effectively in hydrolyzing phosphodiester bonds. And metal complexes carry positive charge would enhance its ability in hydrolyzing BNPP.

In this thesis, we report the synthesis of DO2PA (1,7-dicarboxyethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane) and their metals complex stability constant determined by potentiometric method. We observed that DO2PA is too weak a ligand for the pH titration method to be useful for the determination of the stability constants for most metal ions. Because the metal ions hydrolyze and form hydroxide precipitates before

any measurable complexation takes place. In the BNPP hydrolysis by lanthanide complexes of HEDTA at pH 6.96.-10.89 experiment, the reaction rate increases as atomic number decreases and as pH increases. Further, in the $[LnHEDTA] = 10^{-5}$ mM experiment, we fit the data into simple-saturation kinetic mechanism and obtain the BNPP hydrolysis first order rate constant and the LnHEDTA-BNPP binding constant.



誌謝

研究生的生活結束了，也代表著我即將踏入人生的另一個階段。

首先要謝謝我的指導教授張正老師讓我學習到對於學術研究該有的態度和堅持，同時讓我了解到這樣的態度並不是侷限在學術上的，更是對於自己負責的一種要求。

接著要感謝實驗室的學長姊和學弟：志誠學長、志祥學長、政憲學長、翊帆學長、幸怡學姊、業琳學姊、玉淳學姊、健葦學姊、麟強學弟，還有我的好朋友們，謝謝你們在這兩年中的教導與陪伴，讓我的研究生生活不孤單。

最後，我要謝謝我的家人，謝謝你們在我最脆弱的時候，支持我、鼓勵我，陪著我走過那段我覺得是目前遇到最難熬的時期。有了你們，我就有了勇氣。

兩年的歷練，讓我更了解自己，最重要的是領悟到了不要自我設限。很多時候自己是可以做的更好的，只是被自己的想法限制住了，而駐足在原地不肯也不能往前邁進。要相信自己可以變的更好，而不是限制自己變好。



目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
謝誌.....	iv
目錄.....	v
第一章 緒論.....	1
研究背景.....	1
文獻回顧.....	7
研究目的.....	20
第二章 配位子 DO2PA 的合成.....	21
O,N,O'-Tritosyldiethanoamine 的製備.....	21
N,N',N''-Tritosyldiethylenetriamine 的製備.....	21
Disodium salt of N,N',N''-Tritosyldiethylenetriamine 的製備.....	22
Tetratosylcyclen 的製備.....	23
1,4,7,10-tetraazacyclododecane 的製備.....	24
1,7-bis(benzylcarboxyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane 的製備.....	25
1,7-bis(benzylcarboxyl)-4,10-bis(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane 的製備.....	26
1,7-dicarboxyethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO2PA) 的製備.....	27
第三章 金屬陽離子的準備與標定.....	29
金屬陽離子濃度之標定方法.....	29
金屬陽離子濃度之標定原理.....	30
金屬陽離子濃度之標定.....	32
第四章 配位子 DO2PA 質子化常數之研究.....	36
配位子 DO2PA 水溶液的配製.....	36

配位子 DO2PA 溶液濃度標定.....	36
配位子質子化常數之滴定原理.....	40
配位子 DO2PA 之質子化常數.....	42
第五章 配位子 DO2PA 與金屬陽離子穩定常數之研究.....	44
配位子與金屬陽離子之穩定常數計算原理.....	44
配位子 DO2PA 與金屬陽離子之穩定常數.....	45
第六章 LnHEDTA 之動力學研究.....	49
反應動力學之實驗原理.....	49
LnHEDTA 反應動力學之實驗方法.....	50
動力學實驗步驟.....	51
LnHEDTA 動力學實驗結果.....	52
LnHEDTA 在不同 pH 值下水解 BNPP.....	52
LnHEDTA(Ln=Ce,Nd,Eu,Dy,Er) 水解 BNPP 之 BNPP 濃度效應.....	61
LnHEDTA 水解 BNPP 之 LnHEDTA 濃度效應.....	63
第七章 LnHEDTA 水解 BNPP 之產物分析.....	68
實驗準備與方法.....	69
實驗結果.....	70
第八章 結論與未來展望.....	76
參考文獻.....	79
附錄.....	84

第一章 緒論

*研究背景

在生物的生命系統中，眾多的生化反應都需要酵素(enzyme；酶)進行催化，讓整個生物系統能夠完整的運作，因此酵素在生物體中扮演著非常重要的角色。人類藉由 DNA(deoxyribonucleic acid)上的基因密碼(genetic code)轉錄成 mRNA (messenger ribonucleic acid)，mRNA 再轉譯產生蛋白質，而蛋白質就是酵素的主要成分。上述的這些生物聚合體，需要具有顯著的熱力學穩定性。據估計，在中性 pH、25°C 的一般條件下，DNA 之磷酸雙酯鍵(phosphodiester bond)的半生期高達 13 萬年之久，RNA 的磷酸雙酯鍵水解半生期則約為 4 年，蛋白質的胜肽鍵(peptide bond)水解半生期則為 7 年左右。然而，在某些特定的情況下，生物細胞仍需要進行分解或是修補 DNA 或 RNA 序列，例如精確修補突變或受損的 DNA、轉譯過的 mRNA 需被分解再利用以及分解外來入侵者的 DNA。生物體為了進行這些生化反應就衍生出一連串酵素來催化，這些酵素統稱為核酸水解酶(Nuclease，為 hydrolases 的一種)¹。通常這些自然界中的核酸水解酶，其蛋白質的中心都存在著金屬離子作為輔因子(cofactor)，其中最常做為輔因子的金屬有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 等，這些金屬離子在反應中都扮演著關鍵性的角色。

目前在醫學上，仍然存在著一些難以治療的疾病，例如癌症、遺傳性的疾病，因此，利用具有專一性的藥物或基因療法，是目前最直接也最有效的治療方式。人造核酸水解酶(artificial nuclease/ribonuclease)即是利用具有專一辨識性的藥物，搭配上先進的基因定序技術，將致病的 DNA 或 RNA 序列切除或是抑制其製造出致病的蛋白質，此研究方向在學術價值引起科學家的注意，同時也在科學以及醫學上有著實際的應用價值²。在分子生物學上，雖然已經有天然限制酶可以使用，

但是天然限制酶的辨識區域常只有 4-6 個鹼基，核醣核酸長鏈會被切割成很多小片段，而不是只切割在我們說需要的位置上，造成辨識度不足的缺點，再加上要從生物體內分離純化所需要的成本高。因此，利用人造核酸水解酶，我們可以切割在特定的位置上，並且透過需要來調整辨識區對標的的親和力以及切割區的切割活性，達到特定的目的。另外，透過對人造核酸水解酶的研究，我們可以更進一步的了解天然限制酶的反應機構。

早期有關人造核酸水解酶的研究，主要著重在了解 RNA 水解機制。RNA 在五碳糖的第二位置上有一氫氧基 ($2' -OH$)，這個氫氧基在反應機制中被認為扮演極重要的角色；目前較被廣泛接受水解 RNA 的反應機制包含兩個步驟，轉酯反應 (transesterification) 和水解反應。在第一個步驟的轉酯反應中，RNA 上五碳糖的 $2' -OH$ 會先解離脫掉氫質子 (deprotonation)，並形成強親核基 (nucleophile) alkoxide，之後 alkoxide 會攻擊五碳糖 $3'$ 端磷酸酯鍵之磷原子，形成 $2', 3'$ -cyclic phosphate；在第二個步驟的水解反應中， $2', 3'$ -cyclic phosphate 會水解為 $2'$ -phosphate 及 $3'$ -phosphate，至此完成整個水解反應。然在轉酯反應中，可能會形成一個雙三角椎 (trigonal bipyrimide) 之過渡態，如圖 1-1 所示^{3,4}。

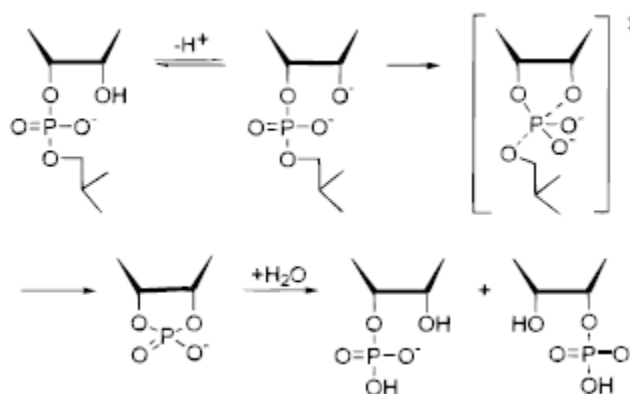


圖 1-1 RNA 水解反應之圖解說明

自然界中的 RNA 常無法穩定的存在，因為有其結構上的優勢，形成 alkaline instability³，水解的速率很快。但是與 DNA 來做比較，可以發現 DNA 的水解就困

難了許多，主要是因為 DNA 在五碳糖的第二位置上是氫，所以水解過程中所需要的親核基就必須由外界提供；再加上，外來的親核基帶負電，而磷酸酯鍵也帶負電，同性相斥的結果，造成 DNA 水解反應更不容易進行，因此 DNA 在自然界可以穩定存在萬年以上。

DNA 的酵素水解通常是依照下列兩步驟，如圖 1-2 所示：

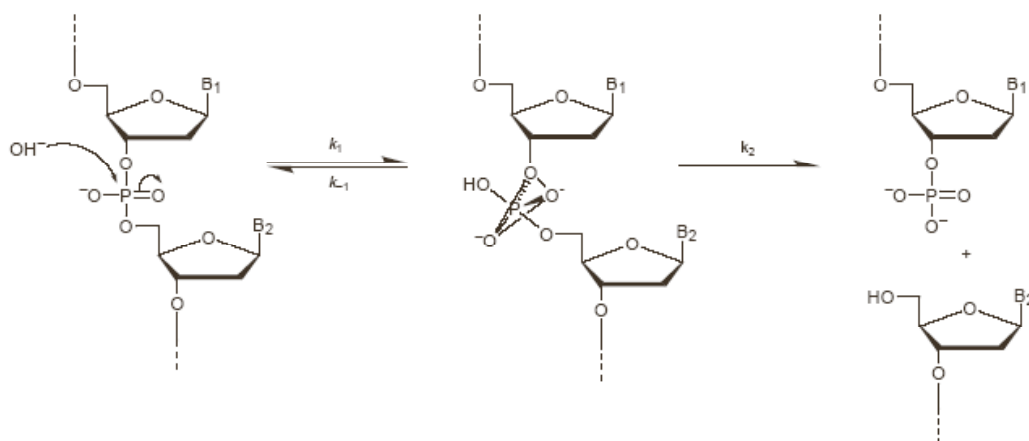


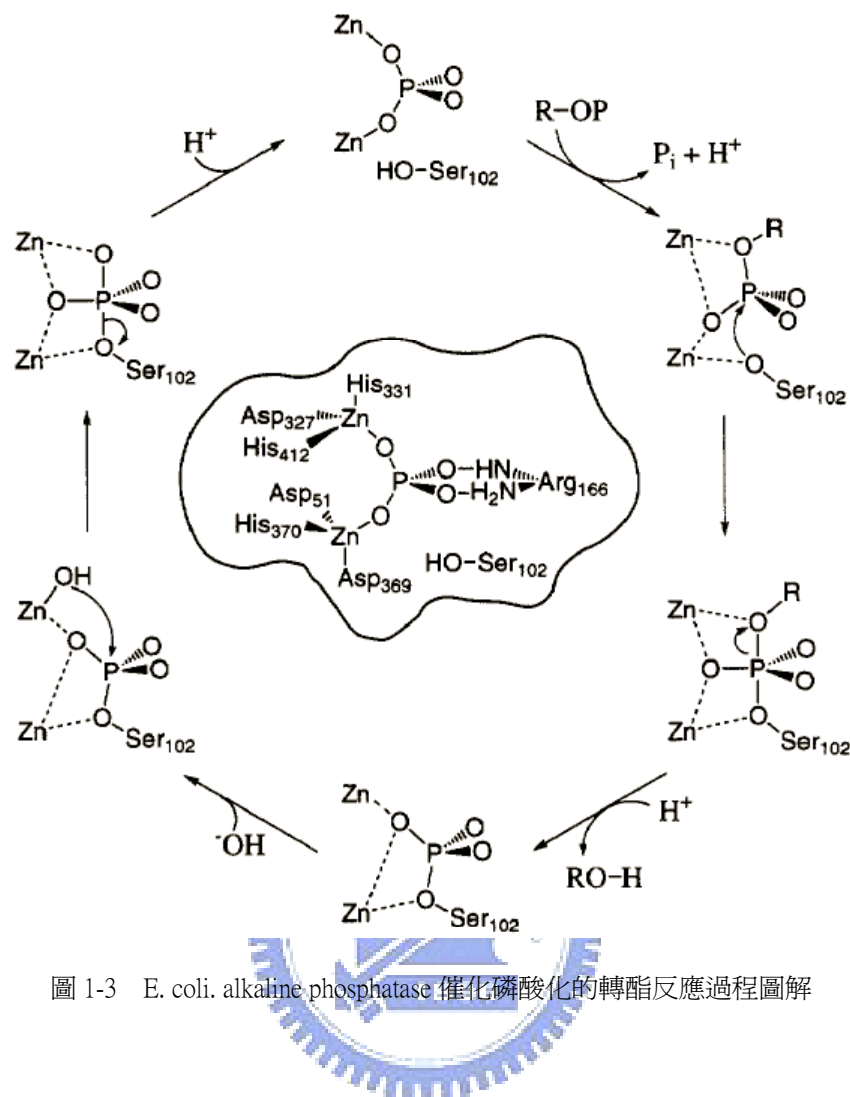
圖 1-2 DNA 水解可能之反應途徑

(1) 藉由外來的親核基攻擊在磷原子上，例如：外來的 OH^- ，形成五配位的中間物 (pentacoordinated intermediate)。

(2) 移除 2'-deoxyribonucleotide 位置上的 5'-OH，且 P-O 鍵斷裂。

此步驟是反應的速率決定步驟。而在非酵素水解反應中，在 3' 端 P-O 鍵的分裂也會發生⁵。

天然的核酸酶和限制酶是非常具有專一性，但是卻有鍵結過強的缺點，加上 DNA 水解不易，RNA 水解速率是比 DNA 快 $10^5 \sim 10^6$ 倍。因此除了參考 RNA 水解的反應特性外，觀察自然界中的水解 DNA 酵素也是一項很好的選擇。最有名的兩個例子：alkaline phosphatase、purple acid phosphatase。以 E. coli. alkaline phosphatase 為例，如圖 1-3 所示，就是兩個含有鋅離子的酵素，利用 Ser102 在鹼性環境下無選擇性的水解磷酸單酯鍵(ROPO_3^{2-})^{1,6,7}。



因此許多科學家便藉由觀察天然的水解磷酸酯鍵類酵素的結構，發現水解過程中若有金屬離子的參與，將會使得轉酯和水解兩個步驟更容易進行。據研究指出，金屬離子在水解過程中可能扮演了下列四種角色，如圖 1-4 所示⁶：

- (a) 和水配位後並解離形成金屬氫氧根離子（metal-bound hydroxy anion），金屬氫氧根離子當作是一個路易士鹼（Lewis base）來拔除 2'-OH 上的氫，使其成為 2'-O-強親核基，攻擊五碳糖 3' 端磷酸酯鍵之磷原子；
- (b) 配位在 2'-OH 的氧原子上，吸引氧原子上電子雲，使 2'-OH 的氫更容易解離，以形成 2'-O-親核基（metal stabilized oxyanion）；
- (c) 轉酯過程中所形成的五配位中間物或過渡態，會由於金屬靜電相吸而提供其穩定性；

(d) 配位在離去基 (leaving group) 上，穩定離去基，使反應朝向水解方向進行。

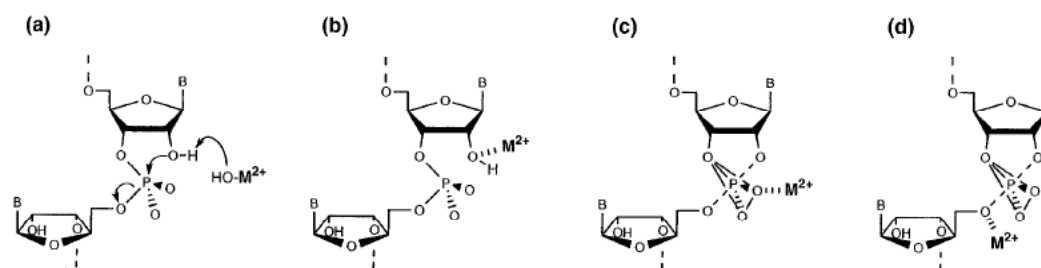


圖 1-4 金屬離子在催化水解反應可能扮演的角色

在親核基攻擊的反應部分，可用來幫助加速水解反應的金屬離子包括鎂離子 (Mg^{2+})、鈣離子 (Ca^{2+})、鐵離子 (Fe^{3+})、鎳離子 (Ni^{2+})、銅離子 (Cu^{2+})、鋅離子 (Zn^{2+})、鉛離子 (Pb^{2+})、鑷系金屬離子 (Ln^{3+})、二氧化鈾離子 (UO^{2+}) 和鈷鹽 (Th salts) 等；非金屬離子的則有 H^+ 、 OH^- 、amines (氨類) 和其他含氮化合物⁸。

由過去的文獻可以得知，由過渡金屬離子和鑷系金屬離子所形成之錯合物的人造切割試劑中，以三價的鑷系金屬離子對於 RNA 的水解是最有效率的⁹，且 RNA 水解反應速率會隨著鑷系金屬的原子序增加而遞增；雖然 Ce^{4+} 被認知是最有效率的 DNA 水解促進劑，但是在 RNA 水解促進劑中，卻發現 Tm^{3+} 、 Yb^{3+} 和 Lu^{3+} 等離子是較有效率的^{10,11}。

雖然鑷系金屬離子在水溶液下是很有效率的 DNA 切割試劑，但其在高 pH 值的水溶液下會產生沈澱¹²，且會對生物體產生毒性；因此設計出一種錯合物是可保有鑷系金屬的水解切割能力，且不具有生物毒性及安全性，是科學家努力的方向。為設計出對鑷系金屬有較高親和力的配位子，我們參照 MRI (magnetic resonance imaging) 核磁共振造影試劑的設計¹³，發現大環配位子遠比線性配位子對鑷系金屬所形成的錯合物較穩定，更發現到當配位子中在氮原子上有 carboxylate group (乙酸基) 的鍵結，可提供一個帶中性或正電的錯合物之設計方法。

在 MRI 試劑中被廣泛研究且穩定的配位子是多胺多羧基大環配位子，其中 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid(DOTA)及 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacetic acid(TETA)，由於對三價的鑰系金屬離子有著高親和力，並在動力學以及熱力學穩定性也都其他配位子較高，所以可以作為人造 DNA/RNA 切割試劑的配位子基本架構。

至今，已經有不少研究團隊投入在人造 DNA/RNA 切割試劑的研究領域中，也有重大的研究結果已經發表，我們將根據這些研究結果作為基礎更進一步的來了解不同配位子及不同鑰系金屬離子錯合物作為人造切割劑的特性以及其應用。



*文獻回顧

【Breslow et al.】

1986-1990 年，Breslow 等人仿照 alkaline phosphate，錯合出含有鋅離子(Zn^{2+})的含氮大環金屬錯合物，並且進行水解磷酸酯鍵 (DPPNPP) 的相關實驗，實驗結果指出在 $\text{pH}=8.7$ $\text{CH}_3\text{CN}_{(\text{aq})}$ 的環境下，人造水解酶的反應速率會大大提升，他們推測在這個 pH 值環境下，有一活性物種 (Zinc hydroxide complex) 產生，即金屬離子上的配位水解離成氫氧根離子形成有效的攻擊基。另外，進一步比較三種大環錯合物對 DPPNPP 的反應速率可得知，接有官能基之金屬錯合物 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¹⁴。

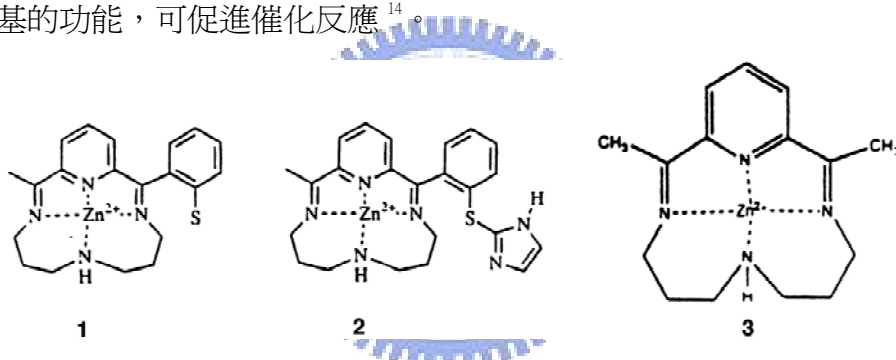


圖 1-5 Breslow 團隊所合成的金屬錯合物

【Hendry 與 Sargeson et al.】

1989-1990 年，Hendry 與 Sargeson 發表含有 Co^{3+} 及 Ir^{3+} 的大環錯合物，並研究其催化水解磷酸雙酯鍵的反應機制，發現 Ir^{3+} 比 Co^{3+} 之體積大，反應過程中大環的包覆性 (closure) 會較差，因此催化速率比 Co^{3+} 的錯合物慢。另外，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。進一步探討發現大環的開闔與否，並不是那麼重要，但是在生物體酵素催化傾向於開放性的結構，且生物中常用來催化的金屬 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 都是比 Ir^{3+} 還大的金屬。因此，此研究團隊所提出的結論較不符合一般生物體內酵素的催化機制¹⁵。

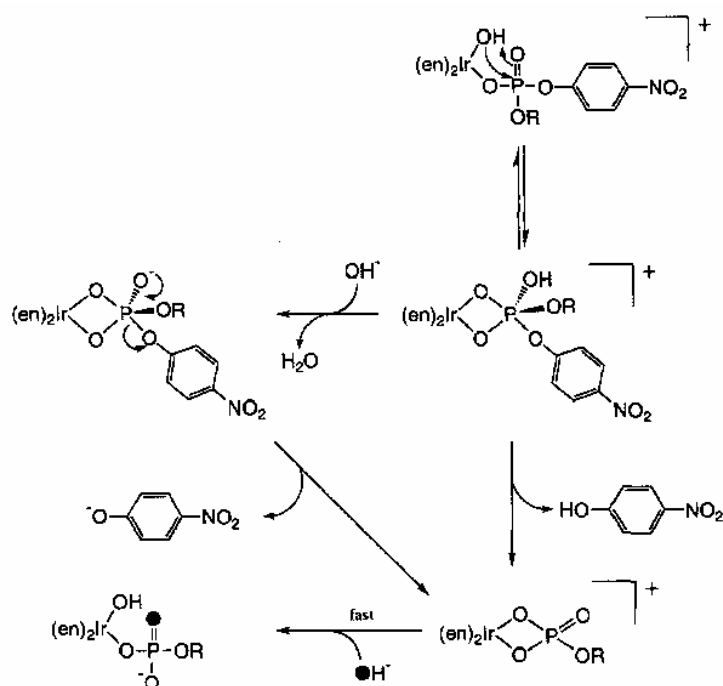


圖 1-6 Hendry 與 Sargeson 推測 Co^{3+} 及 Ir^{3+} 的大環錯合物水解磷酸雙酯鍵可能之機制

【Krämer et al.】

1996 年，Krämer 的研究團隊以雙官能基催化反應為目的設計出其配位子，此系列配位子的結構以 2,2-bipyridine (bpy) 為主體，並在 pyridine 環上 2 的位置接上烷基胺(alkylamine)作為一個胺基酸的類似物。三種配位子，一個為胺基上接有氫，另外兩個分別以乙基及甲基取代，作為立體預先結構化(steric Preorganization)的對照組，三者皆與 Cu^{2+} 錯合形成 L^1Cu 、 L^2Cu 、 L^3Cu ^{16,17}。

其中， L^1Cu 、 L^3Cu 水解 BNPP(bis(p-nitrophenyl)phosphate)的實驗結果，發現 L^1Cu 的反應速率約為 L^3Cu 的 1000 倍，推測其主要原因可能是 BNPP 的磷酸雙酯鍵與金屬離子產生配位作用同時利用氫鍵與其中一個胺基鍵結，經由這樣的雙重活化，加上受質 BNPP 被帶到合適的位向，再由銅離子活化後的配位水進行親核基攻擊，完成整個水解反應。

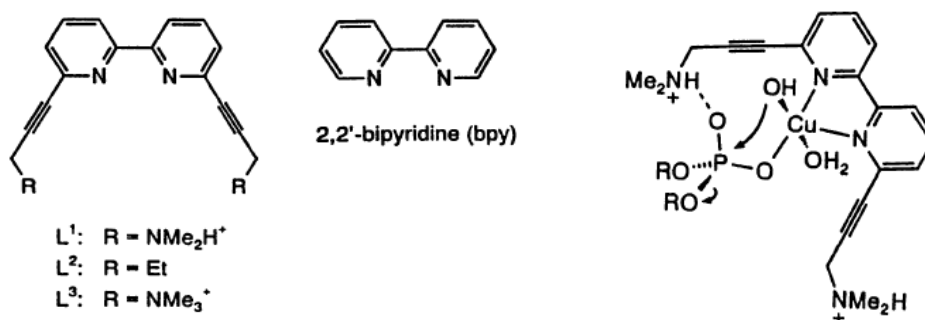


圖 1-7 Krämer 團隊所設計之配位子及其推測的水解反應機制

【Burstyn et al】

自 1993 年開始，Burstyn 以三氮九元環和二價銅離子形成的錯合物為研究主題，進一步的了解此類金屬錯合物水解 BNPP 的反應機構以及特性。首先利用 HPLC 來分析 BNPP 水解完的產物為 p-nitrophenyl phosphate 及 p-nitrophenolate，並進一步證實此金屬錯合物具有高度的選擇性，可與磷酸雙酯鍵反應，而且水解 BNPP 的反應速率約是水解 NPP 的 50 倍¹⁸。除此之外，其水解速率和金屬錯合物的濃度呈現 1/2 次的關係，顯示其中有不具活性的物種產生，他利用動力學的數據計算出此雙體的形成常數 K_f 為 $1220M^{-1}$ ，再根據前人的研究，進一步推測溶液中活性物種為單體，而雙體為不具活性的物種^{18,19,20,21}。另外，在不同濃度受質的實驗中，其切割速率呈現飽和動力學(saturation kinetics)，顯示金屬錯合物和受質在水解過程中，有中間物的產生；在不同 pH 值環境下，發現水解速率在 pH7.3 有明顯的反曲點，即會有一配位水解離，產生水解 BNPP 的活性物種。綜合這些結論，他提出下列的反應機制¹⁹：

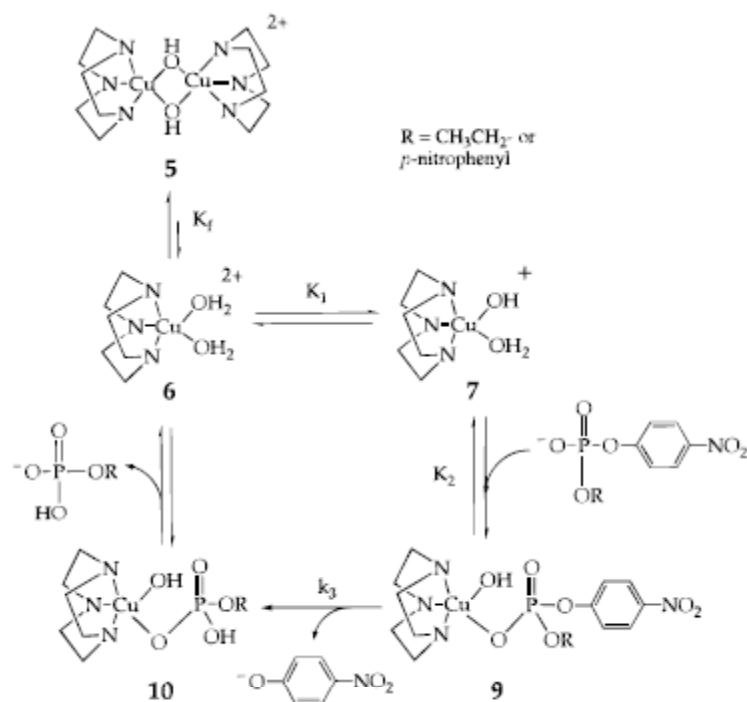


圖 1-8 Burstyn 推測 Cu[9]aneN₃ 水解 BNPP 的反應機制

之後 Burstyn 選取三氮九-十一元環(Cu[9-11]aneN₃)與二價銅離子錯合，進行水解 BNPP 的相關研究，發現水解速率隨著環穴的增大而增加，從九元環到十一元環增加了一個數量級；從金屬的錯合物的晶體結構來分析，環穴越大，銅離子越接近三個氮所構成的平面，即越深入環穴中心，造成 N-Cu-N 的鍵角越大，則其銅離子上的兩個配位水其鍵角越小，使得大環錯合物形成雙體時的立體張力 (steric constraint) 增加，因此計算出來的雙體形成常數 K_f 隨之下降，相對的水溶液中的單體活性物種量就較多，所以水解速率得以提升²⁰。

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_a^a	$K_f (M^{-1})^c$	$k (M^{-1/2} s^{-1})^c$
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_f is pH-dependent (Scheme 2),^{5,16} the reported K_f values are valid at pH 9.2 only.

表 1-1 三氮九-十一元環(Cu[9-11]aneN₃)銅金屬錯合物水解 BNPP 之相關常數

2002 年，Burstyn 爲了進一步了解立體障礙對於大環金屬錯合物水解 BNPP 的影響，他在三氮九元環的三個氮上都接了異丙基²¹，此大環金屬錯合物 Cu(i-Pr₃[9]aneN₃)²⁺其水解速率足足比九元環的銅金屬錯合物快了 60 倍以上。顯示三氮九-十一元環(Cu[9-11]aneN₃)這一類的金屬錯合物，其環穴中心金屬鍵角越大越能阻止不具活性的雙體形成，達到增加水解速率的目的。

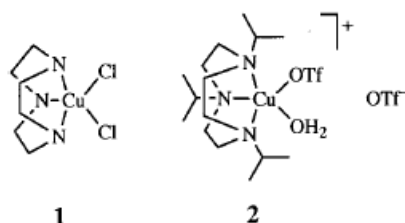


圖 1-9 Burstyn 三氮九元環衍生物之結構

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_f (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}

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

【Morrow et al.】

1992 年，Morrow 發表第一篇關於鐳系金屬錯合物具有催化水解的例子；在過渡金屬、鐳系金屬與六配位的配位子水解 RNA，發現錯合後的大環鐳系金屬錯合物具有非常高的熱力學穩定性。²²Morrow 進一步將單純鐳系金屬來進行 RNA 的轉酯催化反應，發現鐳系金屬的催化能力比一般過渡金屬還來的好，推測是因爲鐳系金屬具有更高的路易士酸的特性，但是後來的研究結果指出，鐳系金屬錯合物的催化效果並非單純遵循路易士酸強度增強而增加，這暗示還有其他因素影

響著催化效果。除此之外，Morrow 推測鑷系金屬的催化機制與一般過渡金屬催化機制是相類似的。

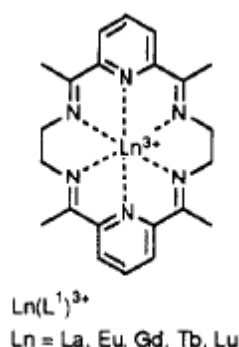


圖 1-10 Morrow 鑷系金屬形成錯合物之配位子結構式

1996 年，Morrow 將八配位的 TCMC (TCMC = 1,4,7,10-tetrakis- (carbamoylmethyl) -1,4,7,10-tetraazacyclododecane) 與具有十配位的 La^{3+} 錯合後，發現 TCMC 與 La^{3+} 之錯合物具有切割 RNA 的效果，但是若將其與只有九配位的 Eu^{3+} 錯合後，發現此錯合物就失去了催化效力。另外，將 Eu^{3+} 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。

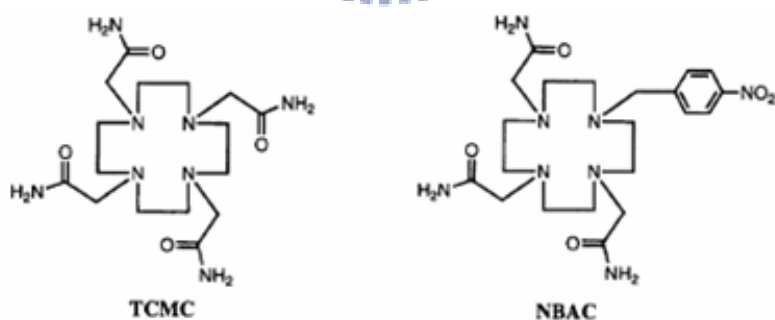


圖 1-11 Morrow 之 cyclen 衍生物八配位的 TCMC 與七配位的 NBAC 配位子結構式

1998 年，Morrow 延續之前以 cyclen 為主體的研究主題，合成酸基、胺基及醇基等混合式四取代基衍生物(見圖 1-12)，進行了許多鑷系金屬錯合物切割磷酸雙酯鍵的研究，發現當取代基中存在有胺基時，可以有效的減少金屬離子的解離，他推測可能是胺基使的整個大環金屬錯合物更加的勁固(rigid)，造成金屬離

子不容易解離出來，進一步證實這些金屬錯合物不僅具有高穩定性，同時對於催化水解反應也有相當好的效果²⁴。

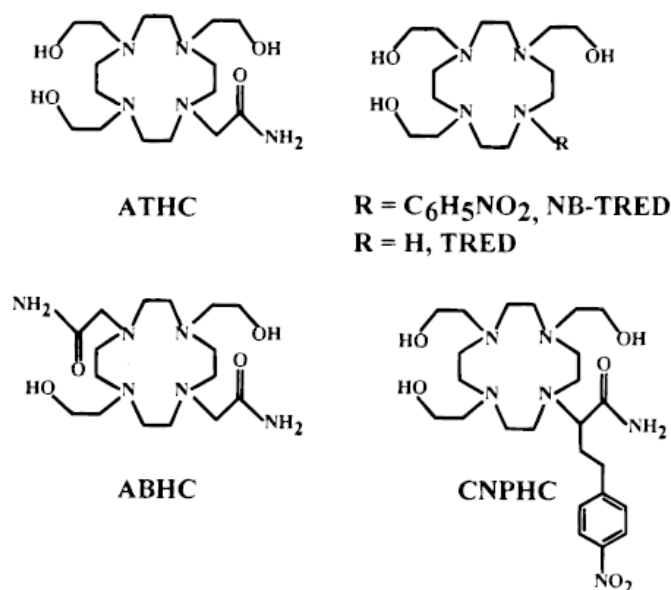


圖 1-12 Morrow 所合成醯胺基及醇基等混合式四取代基衍生物

在此同時，Morrow 的研究由單核金屬錯合物，轉移到多核金屬錯合物上^{25,26,27}。根據之前的研究發現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。依據這個概念，Morrow 發表了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，經由滴定得知，在 pH 7.3 的環境下，具有活性的物種會形成，此活性物種為活化兩個配位水的 Cu₂L(OH)₂²⁺，雙體錯合物的水解 GpppG 的速率是單體的 100 倍。而在雙體錯合物濃度與反應速率實驗中，發現高濃度的時候有飽和的現象，因此推論金屬錯合物可以與 GpppG 以 1:1 及 2:1 的比例進行反應，根據此推論，他推測出反應機制(圖 1-13)，並將相關的數據套入，計算出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。

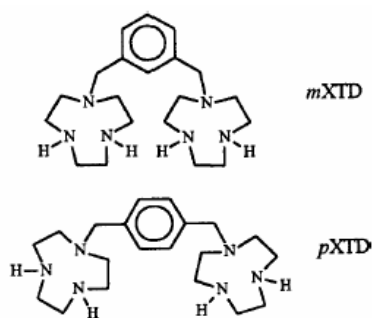


圖 1-12 Morrow 合成的兩種雙體，mXTD、pXTD

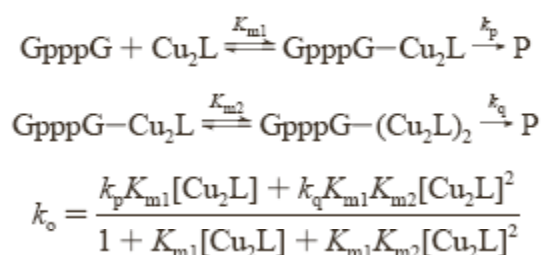


圖 1-13 Morrow 推測的反應機制

2003 年，Morrow 利用 1,3-dibromo-2-propanol 作為架橋，將兩個三氮九元環連結起來形成一新的雙核配位子 L2OH(見圖 1-14)。此配位子，在中性的環境下，可以與兩當量的 Zn^{2+} 錯合形成穩定的錯合物 $\text{Zn}_2(\text{L2O})$ 。在 pH=7.6、25°C 下， $\text{Zn}_2(\text{L2O})$ 水解 HPNP 的動力學實驗結果顯示， $\text{Zn}_2(\text{L2O})$ 的二級反應常數是 $\text{Zn}(\text{L1})$ 的 120 倍。從這結果我們可以知道， $\text{Zn}_2(\text{L2O})$ 的兩個 Zn^{2+} 可以透過協同作用來穩定 HPNP 的中間過渡態(見圖 1-15)，達到增加水解速率的效果²⁶。

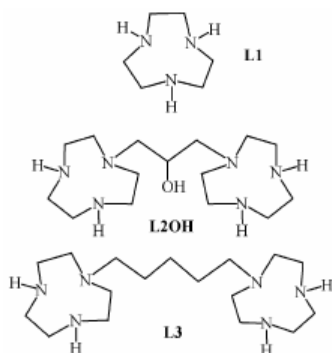


圖 1-14 Morrow 三氮九元環雙核配位子之結構式

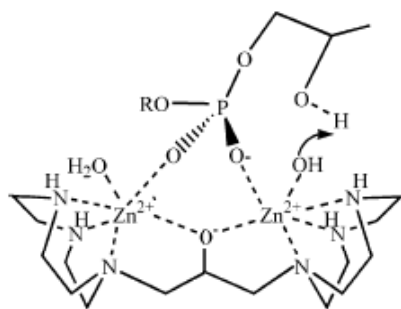


圖 1-15 Morrow 提出的 $Zn_2(L2O)$ ，水解 HPNP 的反應中間結構式

2004 年，延續前一年的研究，Morrow 將配位子 $L2OH$ 與其他過渡金屬元素 (Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+}) 錯合，發現在 pH 9.3、 $25^{\circ}C$ 的環境下， $Cd_2(L2O)$ 的水解 HPNP 的速率，遠比 $Cu_2(L2O)$ 增加了三個級數。此外， $Cd_2(L2O)$ 也展現不同另外兩個金屬錯合物的特性， Cd^{2+} 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 Cu^{2+} 及 Zn^{2+} 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 $Cd_2(L2O)$ 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。



2006 年²⁸，利用雙金屬核錯合物 $Zn_2(L2O)$ 為研究主題，探討雙核金屬錯合物對於受質選擇性的問題，選用了三種不同的受質 HpPNP、UpPNP、UpU，其中 HpPNP、UpPNP 在整個反應中的離去基是屬於弱鹼性的，而 UpU 在反應中的離去基是和 RNA 在反應中的離去基相同的，是屬於強鹼性的。假設在水解反應機制是先形成中間過渡態，中間過渡態再進一步水解形成產物，那麼穩定中間過渡態和離去基就扮演著重要的角色。實驗結果發現 $Zn_2(L2O)$ 提供給 UpU 切割過渡態的穩定度比 UpPNP 多了 2.1 kcal/mol，這證明了 $Zn_2(L2O)$ 可以成功的穩定帶著負電的離去基，進一步了解水解反應機制確實有經過一個中間過渡態，且加速反應速率的其中一個條件就是有效的穩定中間過渡態。另外，HpPNP 切割過渡態的穩定度比 UpPNP 多了 2.4 kcal/mol。Morrow 推測其可以穩定中間過渡態的原因有(1) UpPNP 的立體障礙比較大，導致 UpPNP 與 $Zn_2(L2O)$ 的鍵結相對弱了許多

(2) $Zn_2(L2O)$ 穩定切割 UpU 中 C-5' 離去基的 oxyanion 之效果比穩定切割 UpPNP 的好。

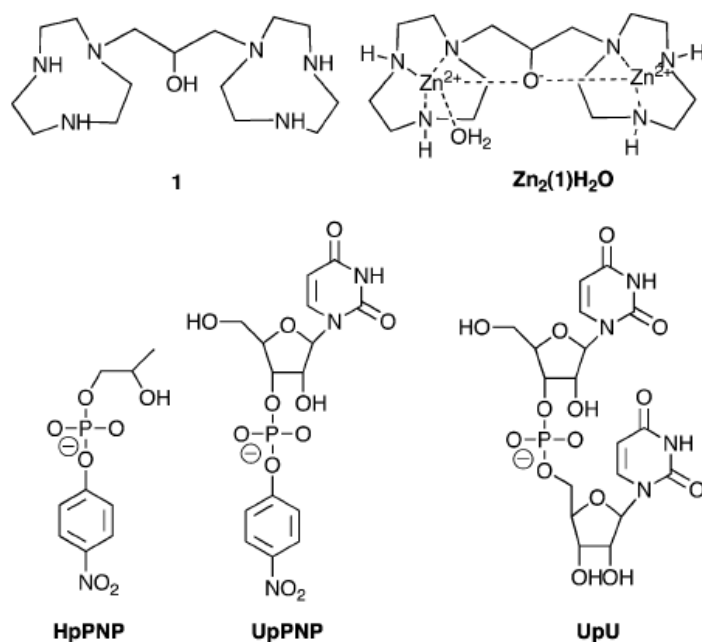


圖 1-16 Morrow 在 2006 年研究的雙核金屬錯合物和受質的結構式

【Yatsimirsky et al.】

自 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^{29,30}。

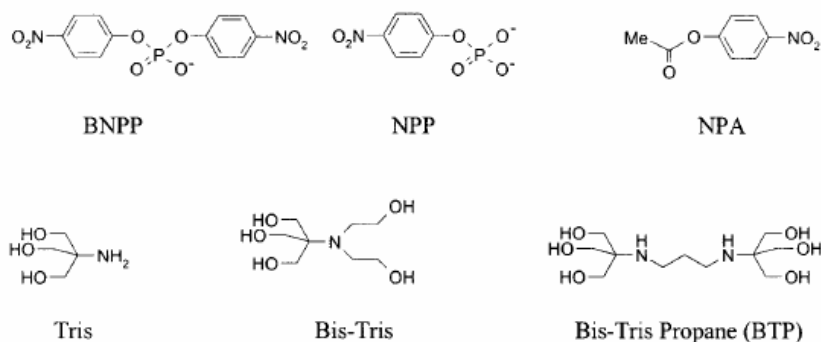


圖 1-17 BTP(Bis-Tri propane) 與 BNPP、NPP 及 NPA 之結構式

在 $25^{\circ}C$ 、 $pH=7-9$ 的環境下，利用電位滴定法決定水溶液中的物種組成，水溶液中一共有四種雙核物種，分別各帶有 2、4、5、6 個 hydroxides。根據動力

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， $\text{La}^{3+} > \text{Pr}^{3+} > \text{Nd}^{3+} > \text{Eu}^{3+} > \text{Gd}^{3+} > \text{Dy}^{3+}$ 。2005 年，更進一步研究以 Ce^{4+} 為主的鑷系金屬離子錯合物，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³¹。

【Thorfinnur et al.】

2005 年發表以 cyclen 為主體的人造核酸水解酶，他將新合成的配位子(見圖 1-18)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 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+} 有兩個配位水，比 Eu^{3+} 多了一個配位水，在 pH 上升後 La^{3+} 兩個配位水皆解離而失去反應活性，因此 La^{3+} 的錯合物水解 HPNP 會隨 pH 值改變，而 Eu^{3+} 錯合物的水解反應則無關 pH 值，以下為其所推論的 La^{3+} 水解模型³²。

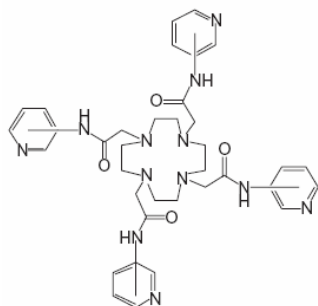


圖 1-18 Thorfinnur 所合成之配位子

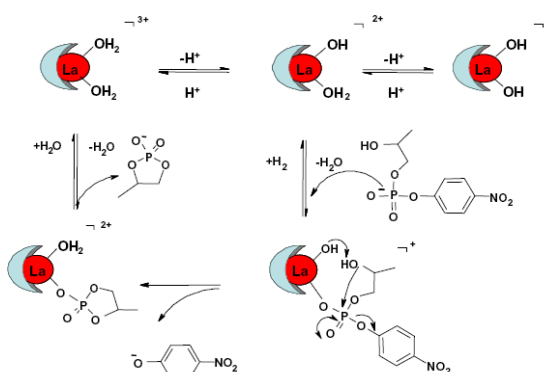


圖 1-19 Thorfinnur 推測 La^{3+} 錯合物之水解反應機制

【Chang et al.】—Our lab

我們實驗室以三氮九元環以及四氮十二元環將其接上乙酸基之衍生物為主

要研究方向，並將這些大環配位子與鑷系金屬錯合來進行人工水解酶的研究。選擇酸基為取代基是因為接上酸基的大環配位子與鑷系金屬錯合後，會形成電中性或帶正電，與帶負電的磷酸酯鍵才能進行有效的反應。

根據前人的研究，我們得知 LnDO_2A^+ 有著良好的熱力學穩定性以及動力學鈍性的錯合物，接著進行了一連串 LnDO_2A^+ 與其它鑷系金屬配位子的動力學實驗。首先進行不同鑷系金屬與 DO_2A 錯合後水解 BNPP 的效率比較，發現 EuDO_2A^+ 具有最好的水解效力；再藉由 EuDO_2A^+ 、 EuK_2IDA^+ 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 EuDO_2A^+ 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^{33,34}。

接著選擇 NO_2A 為研究主題，探討減少配位數對金屬錯合物的影響；另外，為了防止多體錯合物的形成，我們合成了 PhNO_2A ，預期以增加立體障礙來抑制雙體生成。 EuNO_2A^+ 比 EuDO_2A^+ 多一個配位水理應水解效果會比較好，但是實驗結果卻發現與預期的不合。由林玉淳學姊的分子模擬資料顯示³⁵， DO_2A 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為金屬離子深入的原因，使得配位水鍵角及間距較為 EuNO_2A^+ 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³⁶。在 PhNO_2A 的部份，卻因為取代基的立體障礙太大，導致鑷系金屬錯合物的穩定常數很低，不適合進一步做水解 BNPP 的實驗。

另外，在大環配位子的研究中，除了常用的氮原子做為供電子基（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^{37,38,39}。所以實驗室就分別合成了 ODO_2A

和 ONO_2A 。 LnODO_2A^+ 比起 LnDO_2A^+ ($\text{Ln}=\text{Eu}$ 、 Yb) 形成雙體的速度快；在 ONO_2A 的部份，我們發現 ONO_2A 不論在錯合物的穩定度或是在水解 BNPP 的效力上都比 NO_2A 差，推測其原因可能為將氮原子換成了氧原子，使得整個大環變得比較具有彈性，所以金屬離子容易游離出來，另外雖然 LnONO_2A^+ 比 LnNO_2A^+ 多了一個配位水，但也許是因為這個原因， ONO_2A 形成多核沉澱物的情形比 NO_2A 容易，使得水解的能力不佳。

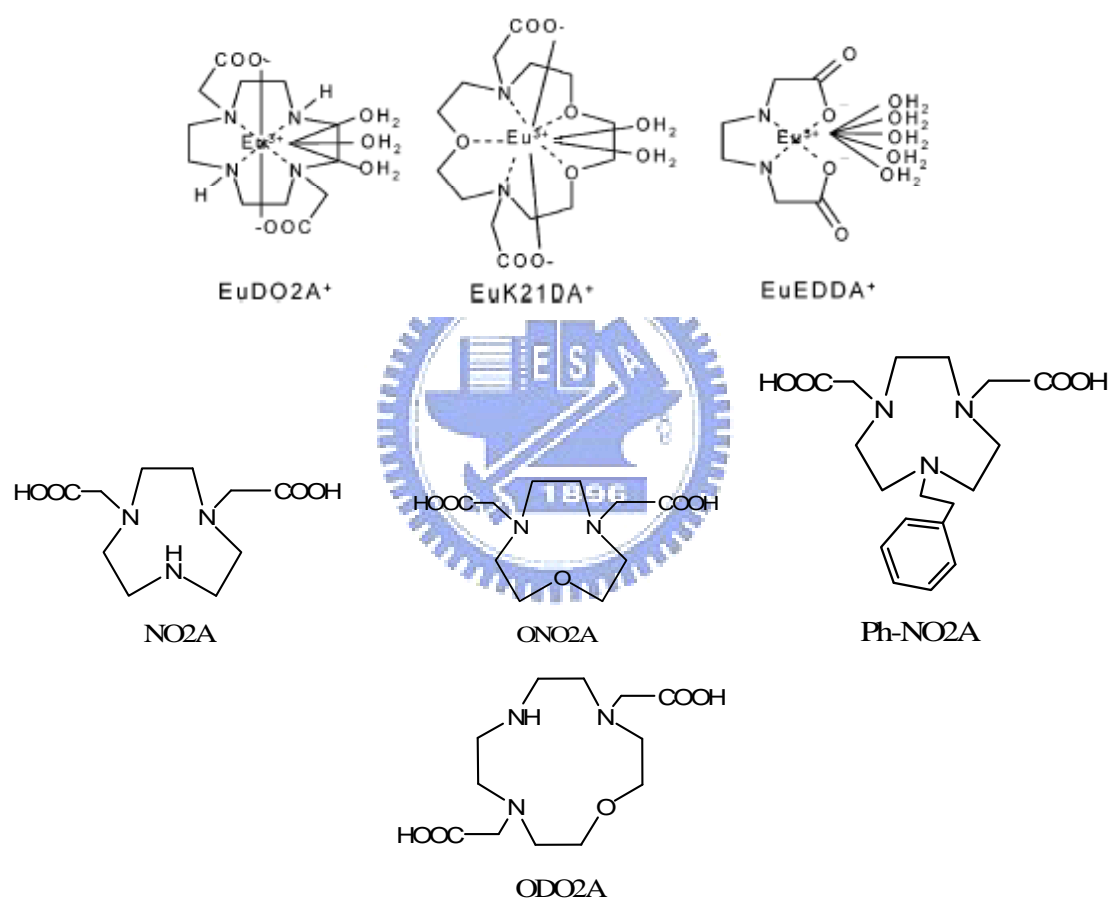


圖 1-20 本實驗室目前所合成的配位子

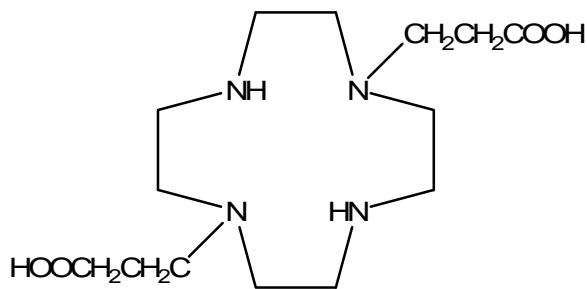
*研究目的

在大環配位子的研究中，除了常用的乙酸基、胺基、醇基做為取代基外，也有人研究用丙酸基或者更長碳鏈的酸基取代基之大環衍生物，發現這類的大環金屬錯合物其穩定度上隨著碳鏈的長短而有差別，同時在水解 BNPP 的效果上也觀察到明顯的變化，可見取代基碳鏈之長短對於大環錯合物在結構上有明顯的影響，而導致這樣的結果。因此，希望藉由合成四氮十二元環的衍生物 DO2PA (1,7-dicarboxyethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane)與鑷系金屬錯合，以期達到下列之目的：

- 1.研究 DO2PA 的熱力學以及與鑷系金屬之配位化學
- 2.研究 LnDO2PA^+ 水解 BNPP 的動力學
- 3.比較 DO2PA 與 DO2A 在錯合物穩定度和水解效力的差異性

另外，在先前實驗室的研究中也發現隨著錯合金屬的不同，其水解 BNPP 的效率也會有所差異，而且也出現了許多不甚了解的結果，為了更進一步了解鑷系金屬在這一方面的影響，選擇 HEDTA 為配位子，因為這類的線型配位子與金屬錯合後反應不似大環配位子複雜，藉由這樣較單純的反應，進而建立鑷系金屬錯合物水解 BNPP 之模式，為了達到此目的，預計完成下列的實驗：

- 1.在不同的 pH 值下，進行 LnHEDTA 水解 BNPP 之動力學實驗
- 2.在不同的 LnHEDTA 濃度下，進行 LnHEDTA 水解 BNPP 之動力學實驗
- 3.利用 HPLC(高效液相層析儀)來進行產物分析

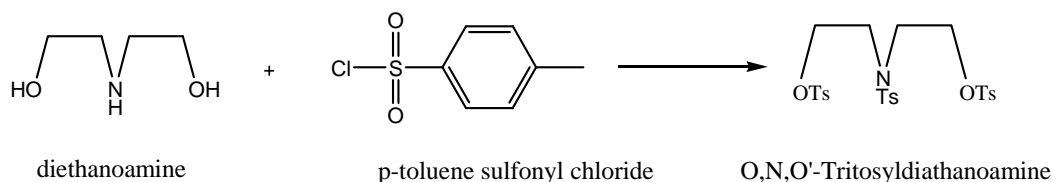


DO2PA

第二章 配位子 DO2PA 的合成

1. O,N,O'-Tritosyldiethanoamine 的製備：

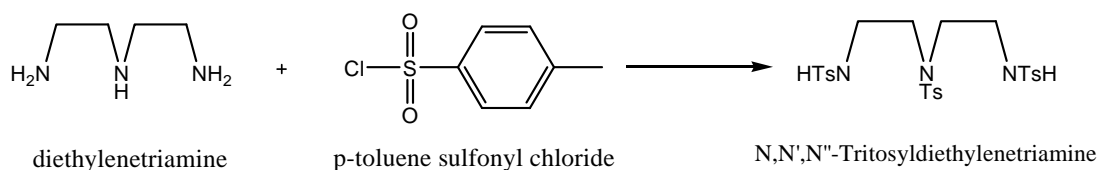
合成圖：



將 21.1 克(0.2 莫耳)二乙醇胺(diethanoamine)加入約 200 毫升三乙基胺(triethylamine)，使其攪拌並置於冰浴中。將大於三個的當量的對苯硫醯氯(p-toluene sulfonyl chloride)約 133.3 克(0.7 莫耳)溶於 600 毫升的乙醚(diethylether)中，並置於加料漏斗中，逐滴將之加入上述溶液中，會漸漸產生大量白色的粉末狀固體。加完後，移除冰浴，使其繼續攪拌 10 小時以上。將固體過濾，用乙醇、水、乙醚各約 500 毫升清洗，得白色粉末固體。用乙醇作再結晶，得白色針狀晶體 97 克，熔點為 90~92℃，產率約為 85%。

2. N,N',N''-Tritosyldiethylenetriamine 的製備：

合成圖：

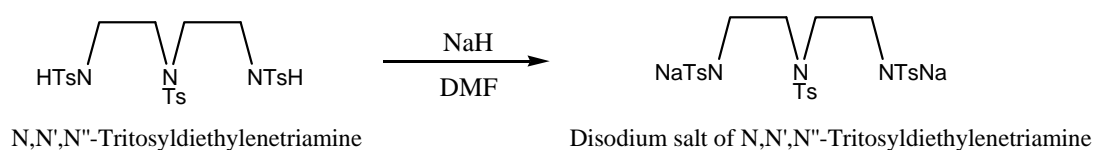


將 20.6 克(0.2 莫耳)的二乙基三胺(diethylenetriamine)加入氫氧化鈉水溶液(28 克氫氧化鈉溶於 200 毫升水)中，使其攪拌並置於冰浴中。將大於三個的當量的對苯硫醯氯(p-toluene sulfonyl chloride)約 133.3 克(0.7 莫耳)溶於 600 毫升的乙醚(diethylether)中，並置於加料漏斗中，逐滴將之加入上述溶液中，會漸漸產生

大量白色的粉末狀固體。加完後，移除冰浴，使其繼續攪拌 10 小時以上。將固體過濾，用乙醇、水、乙醚各約 500 毫升清洗，得白色粉末固體。用乙醇作再結晶，得白色顆粒狀晶體 81 克，熔點為 167~169℃，產率約為 70%。

3. Solution of disodium salt of N,N',N''-Tritosyldiethylenetriamine 的製備：

合成圖：



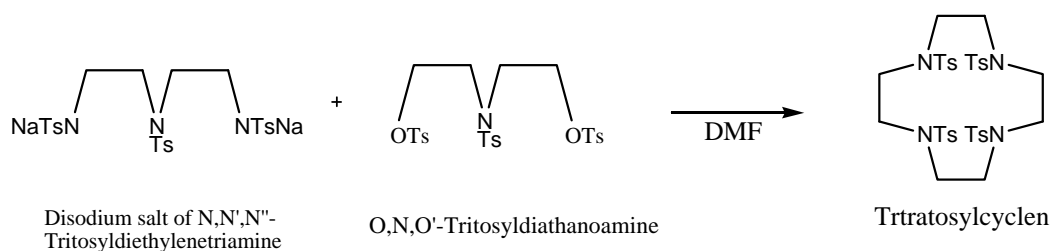
將 28.3 克(0.05 莫耳)的 N,N',N''-Tritosyldiethylenetriamine 溶於 250 毫升 DMF 中，接著緩慢加入 10 克的 NaH 於上述溶液中。加完後，再使其攪拌 30 分鐘。過濾去掉反應完的 NaH，得到淡黃色 disodium salt of N,N',N''-Tritosyldiethylenetriamine 的溶液。

討論：

- (1) 本反應非常劇烈，NaH 要慢慢的加入。另外要小心處理過濾後多餘的 NaH，不要碰到水，不然會有著火的疑慮。
- (2) 本反應可以用鈉金屬，溶劑使用無水酒精，一定要使用無水酒精，因為鈉金屬跟水的反應很劇烈。另外，鈉金屬塊在空氣中暴露太久，會被氧化發熱，有著火的危險。

4. Tetratosylcyclen 的製備：

合成圖：



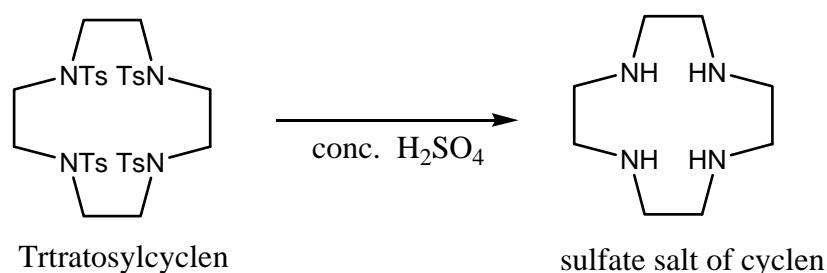
將上述 3. 利用油浴加熱至 100~110°C。將 29.9 克的 O,N,O'-Tritosyldiethanoamine 溶於約 200 毫升的 DMF 中，接著將其用分液漏斗逐滴加入以加熱至 100~110°C 的 3。滴加完成後，繼續在 100~110°C 下反應 10 小時以上，得到澄清的橙色液體。接著將橙色液體減壓濃縮至約 200 毫升，此時會有大量的固體產生。將濃縮完含有固體的溶液緩慢加入攪拌中的大量清水中(約 1 公升)，會有大量的米白色粉狀固體產生。過濾取的粉末狀固體，並用水和乙醇清洗固體。接著將已乾燥的粉末狀固體溶於約 350 毫升的氯仿(chloroform)中，然後用相同體積已沸騰的酒精加入其中作再結晶，得到白色的粉狀固體 25.6 克，熔點為 294~296°C，產率約為 65%。

討論：

- (1) Solution of disodium salt of N,N',N''-Tritosyldiethylenetriamine 與 O,N,O'-Tritosyldiethanoamine 的濃度約為 0.1M 與 0.2M 時，產率較高。
- (2) 再結晶時，是將粗產物溶於氯仿中，再加酒精逼出固體。先濾掉少量析出的固體，取中間析出的部分較純。

5. Cyclen(1,4,7,10-tetraazacyclododecane)的製備：

合成圖：



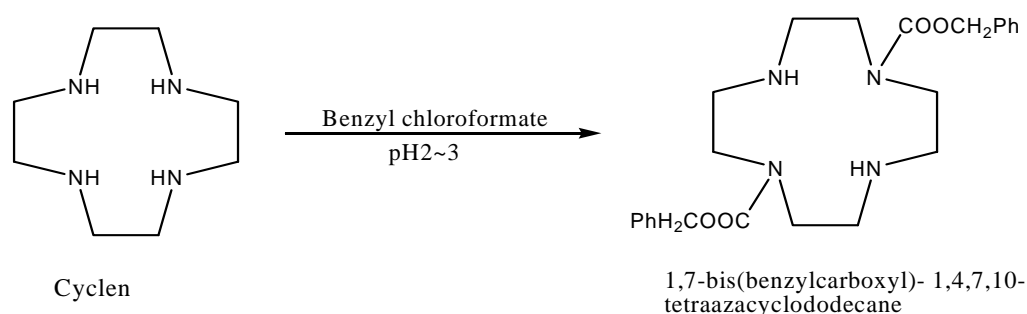
將 24 克(約 0.03 莫耳)的 Tetratosylcyclen 溶於 120 毫升的濃硫酸中，在 120~130 °C 下反應 56 小時以上，得到黑褐色的濃稠液體。等卻後，慢慢加入約 700 毫升的乙醚清洗，並劇烈攪拌，會有固體產生，停止攪拌待固體沉澱置燒杯底部，再將乙醚慢慢倒出，留下固體；如此進行四次，接著風乾，得到易潮解的灰色固體。將上述的灰色固體溶於約 300 毫升的二次水中，加熱至約 60°C 移除殘留的乙醚，接著加入活性炭及碳酸鋇在 80°C 下反應 30 分鐘。過濾移除活性炭及碳酸鋇，並用 12N 的氫氧化鈉將溶液的 pH 值調至大於 12。接著減壓濃縮，將體積濃縮成約 150 毫升，接著用相同體積的氯仿(chloroform)萃取三次，收集氯仿層，抽乾氯仿得到白色的固體 4.38 克，產率約為 84%。

討論：

(1)如果溫度超過 150°C，反應時間要縮短，不然會導致溶液變的非常黏稠，無法用乙醚清洗。

6. 1,7-bis(benzylcarboxyl)- 1,4,7,10-tetraazacyclododecane 的製備⁴⁸：

合成圖：



將上述萃取之大環 5 克(約 29 毫莫耳)，溶於 85 毫升的二次水中，並用 2M 的 HCl 將 pH 值調整至 2-3，再加入 60 毫升的對二氧六圓(p-dioxane)，在冰浴中攪拌。將約 13.75 克(80.6 毫莫耳)的 benzylchloroformate(2 當量，約 30%的過量)溶於 40 毫升的對二氧六圓中，並用約 8~10 小時的時間緩慢將 benzylchloroformate 加入上述的溶液中。在滴加過程中用 2M 的 NaOH 維持 pH 值在 2~3，待加完 benzylchloroformate 且 pH 值不再變化後，減壓濃縮抽乾，會得到黃色帶有白色固體的油狀物。抽乾產生的油狀物用 200 毫升的乙醚清洗四次，接著加入約 80 毫升 20%(w/v)氫氧化鈉水溶液溶解之。用 150 毫升 x4 的乙醚萃取，收集乙醚層並用 5%(w/v)40 毫升 x2 清洗，接著加入硫酸鈉乾燥之，減壓濃縮抽乾乙醚，得油狀物 10.5 克，產率約為 78%。

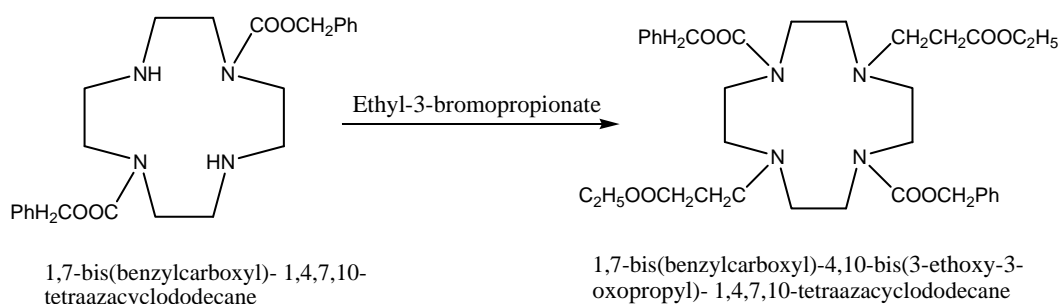
討論：

- (1)此反應溶劑若用 THF，產率相對的降低很多。
- (2)水和對二氧六圓可形成沸點較兩者低的共沸物，使得反應物可以在同一相中反應，提高反應的效率。
- (3)根據參考文獻，粗產物第一次用乙醚清洗，可以洗去四取代的副產物。

7. 1,7-bis(benzylcarboxyl)-4,10-bis(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane

的製備⁴⁸：

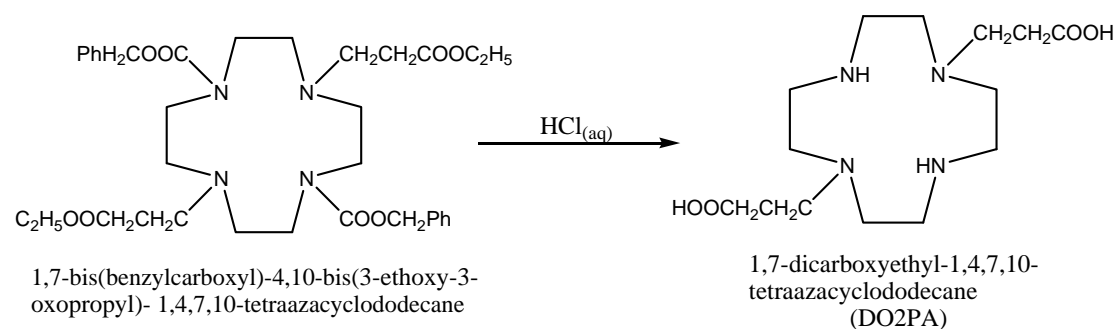
合成圖：



將上述油狀物(1,7-bis(benzylcarboxyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane) 11.4 克 (25.9 毫莫耳) 溶於乾燥過的乙腈(Acetonitrile) 100 毫升中，再加入 8.04 克的 N,N-diisopropylethylamine，並加熱至 50°C。將 12.45 克(68.8 毫莫耳)的 Ethyl-3-bromopropionate 緩慢加入上述的溶液中，在 75°C 下持續反應 72 小時。減壓濃縮抽乾得黃色油狀物。加入 200 毫升乙醚溶解此油狀物，並加入 80 毫升的二次水，進行萃取，收集乙醚層。接著依序用二次水 80 毫升 x2、5%氫氧化鈉水溶液 50 毫升 x2、二次水 80 毫升 x2 清洗乙醚層，並用無水硫酸鈉乾燥之。減壓濃縮抽乾乙醚，得黃色油狀物 4.8 克，產率約為 29%。

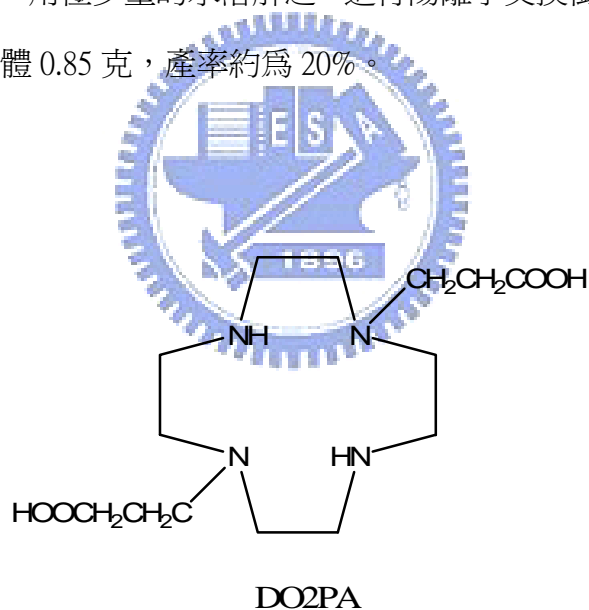
8. 1,7-dicarboxyethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO2PA)的製備：

合成圖⁴⁷：



取上述油狀物(1,7-bis(benzylcarboxyl)-4,10-bis(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1,4,7,10-tetraaza- cyclododecane) 8.2 克加入 200 毫升 1N 的鹽酸水解之，加熱迴流 24 小時。減壓濃縮抽乾鹽酸，用極少量的水溶解之，進行陽離子交換樹脂的純化，去除雜質。得到米色的固體 0.85 克，產率約為 20%。

9.DO2PA 的鑑定：



(1)元素分析儀 EA：anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 3\text{HCl} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$

C%，36.99； H%，7.72； N%，12.33

Found： C%，36.88； H%，7.72； N%，12.48

(2)核磁共振儀 ^{13}C NMR、 ^1H NMR、2D NMR：見附錄

(3)電灑法質譜儀 MS(ESI)：M/Z 317.1([M+H⁺])

討論：

從 ^{13}C NMR 看來，似乎少了一個 peak。根據 1996 年 Guillard 團隊在 Synthetic communication 發表了一篇論文⁴⁰，其團隊合成了一系列含氮大環的衍生物，其中的衍生物 2a 即是以 cyclen 為主體並且在四個氮上都接上了丙酸基，與我們所合成的 DO2PA 相似，在此衍生物的 ^{13}C NMR 分析可以觀察到也是有減少一個 peak 現象；另外，同時參考 2D 的 NMR 圖譜，可以發現在 δ (ppm) : 41.44 的這根 peak 有重疊的現象發生，再將元素分析與 ESI-MS 的結果一起整合，所以我們合理的斷定產物的確是 DO2PA。

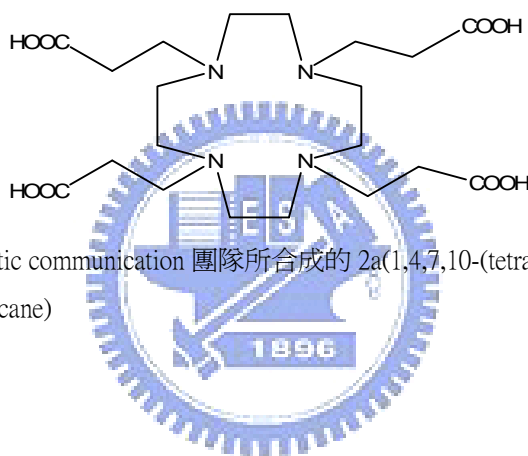
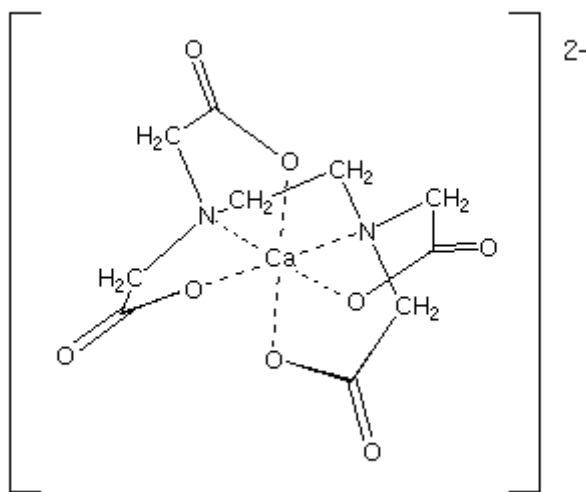


圖 2-1 Guillard 在 Synthetic communication 團隊所合成的 2a(1,4,7,10-(tetra-2-carboxyethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane)

第三章 金屬陽離子的準備與標定

*金屬陽離子濃度之標定方法

爲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，建立在配位子與金屬陽離子濃度都準確的基礎上，所得的穩定常數才具有意義。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 (Ethylene Diamine Tetraacetic 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)，其莫耳比率爲 1：1。



標定金屬離子濃度的實驗，除了配位子試劑及金屬離子外，尚需金屬離子指示劑 (indicator) 及緩衝溶液 (buffer)。例如Eriochrome Black T在pH 10.0的金屬離子水溶液中爲酒紅色，而當足量的EDTA與金屬離子螯合反應後，溶液會由酒紅色轉爲藍色，此時即達滴定終點。

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以知濃度的 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}_{(\text{aq})}$ 及適合的指示劑來直接滴定未知金屬離子溶液濃度。

2. 反滴定法 (back titration method)：

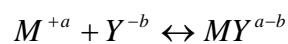
先加過量的 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}_{(\text{aq})}$ 到金屬溶液中，再利用標準的其他金屬溶液(Zn^{2+} 、 Mg^{2+}) 滴定過量的 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}_{(\text{aq})}$ 達滴定終點。此方法適合以下幾種情況：(A) 金屬離子與 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}_{(\text{aq})}$ 反應速率遲緩；(B) 無適合的金屬離子指示劑；(C) 金屬離子容易產生沉澱。

3. 交換反應滴定法 (exchange reaction titration method)：

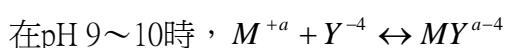
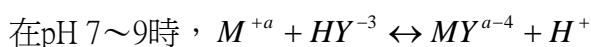
過量的 Zn-EDTA 或 Mg-EDTA 加入金屬溶液中，若欲分析的金屬與 EDTA 形成更穩定的錯合物，則 Zn^{2+} 或 Mg^{2+} 會游離，再以標準的 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}_{(\text{aq})}$ 標定其濃度。此法適用於無適合指示劑可用時。實驗中，所有用來與配位子 DO2PA 錯合的金屬溶液，濃度都是以 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ 直接滴定法標定而得。

*** 金屬陽離子濃度之標定原理⁶⁴**

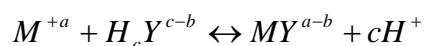
當金屬陽離子與配位子試劑莫耳數以1：1的比例混合之後，通常會有下列的反應發生：



例如， $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ (H_2Y) 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：



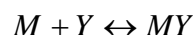
寫成平衡通式如下：



平衡常數 K 可寫成下式：

$$K = \frac{[MY][H]^c}{[M][H_c Y]} \quad \text{式 (a.)}$$

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} ：

$$K_{MY} = \frac{[MY]}{[M][Y]} \quad \text{式 (b.)}$$

實驗過程中，為避免氫離子對金屬離子指示劑造成干擾，在標定金屬離子時，pH值必須要維持一定的值。例如以 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ 標定 Ca^{+2} 時，pH值要保持在9.0～10.0左右，其主要反應平衡式如下：



$[Y^{-4}]$ 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：

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（ $H_n Y \leftrightarrow H_{n-1} Y + H^+$ ）

$$[Y^{-4}] = \alpha_4 C_T \quad \text{式 (d.)}$$

$$C_T = [Y^{-4}] + [HY^{-3}] + [H_2 Y^{-2}] + [H_3 Y^{-1}] + [H_4 Y] \quad \text{式 (e.)}$$

$$\alpha_4 = \frac{[Y^{-4}]}{C_T} = \frac{K_1 K_2 K_3 K_4}{K_1 K_2 K_3 K_4 + K_1 K_2 K_3 [H^+] + K_1 K_2 [H^+]^2 + K_1 [H^+]^3 + [H^+]^4} \quad \text{式 (f.)}$$

根據式 (c.)、式 (d.) 可得：

$$K_{MY} \times \alpha_4 = \frac{[MY^{4-a}]}{[M^{+a}]C_T} = K_{MY} \quad \text{式 (g.)}$$

K_{MY} 為條件形成常數 (conditional formation constant)，會隨著pH值不同而有所不同。

*金屬陽離子濃度之標定

1.藥品的準備：

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。



2.金屬陽離子與緩衝溶液的配製：

A. 0.10 M Ca^{2+} 溶液的配製：

將過量 $\text{CaCO}_3(s)$ 放置在100 °C的烘箱2~3小時，烘乾後秤取1.009 g，溶於少量的二次水中，小心地滴入12.0 N $\text{HCl}_{(aq)}$ 將 $\text{CaCO}_3(s)$ 慢慢溶解，最後以100 ml的定量瓶加二次水稀釋成0.10 M的 $\text{Ca}^{2+}_{(aq)}$ ，此為標準濃度的 $\text{Ca}^{2+}_{(aq)}$ 。

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

秤取9.306克 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}_{(s)}$ ($M=372.24 \text{ g/mol}$)，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：

◎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。

◎取Murexide粉末0.02g，用10ml定量瓶將之加水稀釋成0.2%的溶液。

◎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：

緩衝溶液的配製根據Henderson-Hasselbalch equation，

$$-\log[H_3O^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad \text{即, } pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

由所需緩衝溶液的pH值及 K_a 值，可以求得共軛酸鹼的比例。

◎ $NH_3/NH_4^+_{(aq)}$ 0.10 M pH 10.0 : ($K_a=5.70 \times 10^{-10}$)

$$10.0 = 9.24 + \log \frac{[NH_3]}{[NH_4^+]} \quad , \quad \frac{[NH_3]}{[NH_4^+]} = 5.75$$

取 $\frac{1}{6.75} \times 0.10 M \times 0.50 L \times 53.49 g/mole = 0.40 g$ 的 $NH_4Cl_{(s)}$ ，溶於少量二次水，

以 $\frac{5.75}{6.75} \times 0.10 M \times 0.50 L \times 35.05 g/mole \div 0.894 g/ml \div 29\% = 5.76 ml$ 的 $NH_4OH_{(aq)}$

(29%) 調整pH值至10.0，補水至500ml。

◎ $NH_3/NH_4^+_{(aq)}$ 0.10 M pH 7.0~8.0 : ($K_a=5.70 \times 10^{-10}$)

$$7.5 = 9.24 + \log \frac{[NH_3]}{[NH_4^+]} \quad , \quad \frac{[NH_3]}{[NH_4^+]} = 0.018$$

取 $0.10 M \times 0.50 L \times 35.05 g/mole \div 0.894 g/ml \div 29\% = 6.76 ml$ 的 $NH_4OH_{(aq)}$ ，以

$$\frac{1}{1.018} \times 0.10 M \times 0.50 L \times 36.64 g/mole \div 1.18 g/ml \div 37\% = 4.12 ml \text{ 的 } HCl_{(aq)} (37\%)$$

調整pH值至7.0~8.0，補水至500 ml。

◎ $CH_3COONa/CH_3COOH_{(aq)}$ 0.10M pH5.0~6.0 : ($K_a=1.75 \times 10^{-5}$)

$$5.5 = 4.76 + \log \frac{[CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]} \quad , \quad \frac{[CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]} = 5.50$$

取 $\frac{5.50}{6.50} \times 0.10 M \times 0.50 L \times 82.03 g/mole = 3.47 g$ 的 $CH_3COONa_{(s)}$ ，溶於少量二次水

中，再以 $\frac{1}{6.50} \times 0.10 M \times 0.50 L \times 60.05 g/mole \div 1.049 g/ml = 0.44 ml$ 的 $CH_3COOH_{(aq)}$

調整pH值到約5.0~6.0，再補水至500 ml。

E. 金屬陽離子溶液的配製：

◎過渡金屬離子 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 溶液的配製：

稱取足量的 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}_{(s)}$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}_{(s)}$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}_{(s)}$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}_{(s)}$ ，加二次水配製成100 mM的100 ml水溶液。

◎鑷系金屬離子 La^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Pr^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Gd^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Er^{3+} 、 Tm^{3+} 、 Yb^{3+} 、 Lu^{3+} 溶液的配製：

稱取足量的 $\text{Ln}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}_{(s)}$ ，加二次水配製成20 mM鑷系金屬離子20 ml水溶液。

3. 標定金屬陽離子

A. EDTA的標定

取5ml Ca^{2+} 溶液以及10ml $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 0.10 M pH 10.0緩衝液，混合於小燒杯中，加入兩滴0.2% 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

◎ Cu^{2+} ：取1ml EDTA溶液及5ml $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 0.10 M pH 7.0~8.0緩衝液，混合於小燒杯中，加入兩滴0.2% 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。

◎ Ni^{2+} ：取1ml EDTA溶液及5ml $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 0.10 M pH 7.0~8.0緩衝液，混合於小燒杯中，加入兩滴0.2% 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。

◎ Zn^{2+} ：取1ml EDTA溶液及5ml $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 0.10 M pH 7.0~8.0緩衝液，混合於小燒杯中，加入兩滴0.2% 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。

◎ Cd^{2+} ：取1ml EDTA溶液及5ml $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 0.10 M pH 7.0~8.0緩衝液，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

因為鑷系金屬在高pH值的水溶液環境下會產生 $\text{Ln}(\text{OH})_3$ 的沉澱，故標定其濃度的時候用低pH值的緩衝液。取2ml Ln^{3+} 溶液及8ml $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 0.10 M pH 5.0~6.0緩衝液，混合於小燒杯中，加入兩滴1.0% 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DO2PA質子化常數之研究

* 配位子 DO2PA 水溶液的配製

根據送測元素分析儀Heraeus CHN-O Rapid的結果，N%，12.48；C%，36.88；H%，7.72。在考慮合成DO2PA鹽類的過程，可以合理推測合成後DO2PA鹽類應該有HCl及結晶水。經過多種的可能組合推算，鹽類應為DO2PA · 3HCl · 1.5H₂O，計算得分子量為452.8。

稱取0.1705 g的DO2PA · 3HCl · 1.5H₂O，溶於少量二次水，加入定量瓶中，補二次水達20 ml，為約20 mM的DO2PA_(aq)母液。再取10 ml的DO2PA_(aq)母液，定量瓶稀釋達20 ml，為約10 mM之DO2PA_(aq)。

* 配位子DO2PA溶液濃度標定



爲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TMAcI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。

1. TiNet 2.4軟體設定：

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

2. TMAOH 溶液的標定：

A. 配製一級標準酸KHP (potassium hydrogen phthalate) 溶液：

取多量的KHP_(s)，置於70 °C烘箱中3小時，乾燥。稱取2.042 g之KHP_(s)，以二

次水溶解，加入100 ml定量瓶，配成0.10 M的KHP_(aq)標準液。

B.配製TMAOH（tetramethylammonium hydroxide，(CH₃)₄NOH）溶液：

取22.73 ml的TMAOH_(aq)（～1.1 M）母液，加入50 ml的定量瓶，以二次水稀釋，得約0.50 M的TMAOH_(aq)，為滴定用之鹼液。

配好的鹼液裝置到702 SM Titrino，Metrohm中，鹼液瓶的蓋子除了流通的管線外，還要再接上一瓶的鹼石灰（eg., Sodalime，Merck），以除去空氣中過多的水氣及二氧化碳，維持鹼液的濃度。另外，滴定槽接循環水流，控制溫度在25±0.1 °C。滴定槽內加入0.50 ml的KHP_(aq)標準液，在補二次水達5.0 ml，攪拌子攪拌平衡，以Metrodata TiNet 2.4，Metrohm軟體為滴定計量。TMAOH_(aq)與KHP_(aq)之滴定為一般的酸鹼平衡，設定值為

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

$$\text{signal drift} = 5 \text{ mv/min}$$

$$\text{equilibrium time} = 100 \text{ s}$$

重複3-5次滴定，由軟體所定出的反曲點平均。再由0.50 ml的0.10 M KHP_(aq)所需的TMAOH_(aq)體積計算標定TMAOH_(aq)的濃度。

3. 配製 TMACl（tetramethylammonium chloride，(CH₃)₄NCl）溶液：

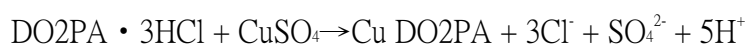
取多量的TMACl_(s)，置於70 °C烘箱中3小時，乾燥。稱取4.38 g之TMACl_(s)，二次水溶解，加入20 ml定量瓶，配成2.0 M的TMACl_(aq)，為所需之離子強度劑。離子強度的計算方法：

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

[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

以CuDO2PA為例：



$$\mu = 1/2 [3(-1)^2 + (-2)^2 + 5(+1)^2] = 6$$

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

需補2 M TMACl_(aq)： $[(0.10 - 6 \times 0.002) \times 5.0] \div 2 = 0.22$ (ml)

4. 以 TMAOH_(aq)標定配位子 DO2PA 溶液：

在滴定槽中加入 1000 μ l DO2PA(~10mM)_(aq)；250 μ l TMACl_(aq)(2M)；

3750 μ l 二次水，配成體積 5 ml，配位子濃度 2.0 mM， $\mu=0.10$ M 之滴定溶液，

控制溫度在 25.0 \pm 0.1 $^{\circ}$ C，攪拌子攪拌平衡。

滴定前，電極先以pH 7.00；pH 4.01；pH 9.95三個標準液做校正，

pH(as)=7.0 \pm 0.10；slope=0.999 \sim 0.985。

TiNet設定為

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

$V_{\text{stop}} = 0.13\text{ml}$ (先估算超過配位子6.5倍的當量)

signal Drift = 1 mv/min

equilibrium time = 200 s

滴定超過5個DO2PA當量的TMAOH(aq)，會在約3個當量TMAOH(aq)

體積，產生一個反曲點。

5. 以 TMAOH_(aq)標定配位子 CuDO2PA 溶液：

因為合成的過程中，生成配位子鹽酸鹽，一個DO2PA不一定有整數個HCl。

為求精確，還要再以Cu²⁺錯合標定，以交叉確定DO2PA_(aq)的濃度。

配製體積5 ml，配位子濃度2.0 mM， $\mu=0.10$ M之滴定溶液：

取1000 μ l DO2PA (aq)、已標定濃度的CuSO₄(aq)，過量5%，即10.50 mmole、220.0

μ l TMACl (aq)，補足二次水達5 ml，控制溫度在25.0 \pm 0.1 $^{\circ}$ C，攪拌子攪拌平衡。

TiNet設定為

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

$V_{\text{stop}} = 0.13\text{ml}$ (先估算超過配位子6.5倍的當量)

signal Drift = 1 mv/min

equilibrium time = 200 s



會在大約第五個當量處出現反曲點。

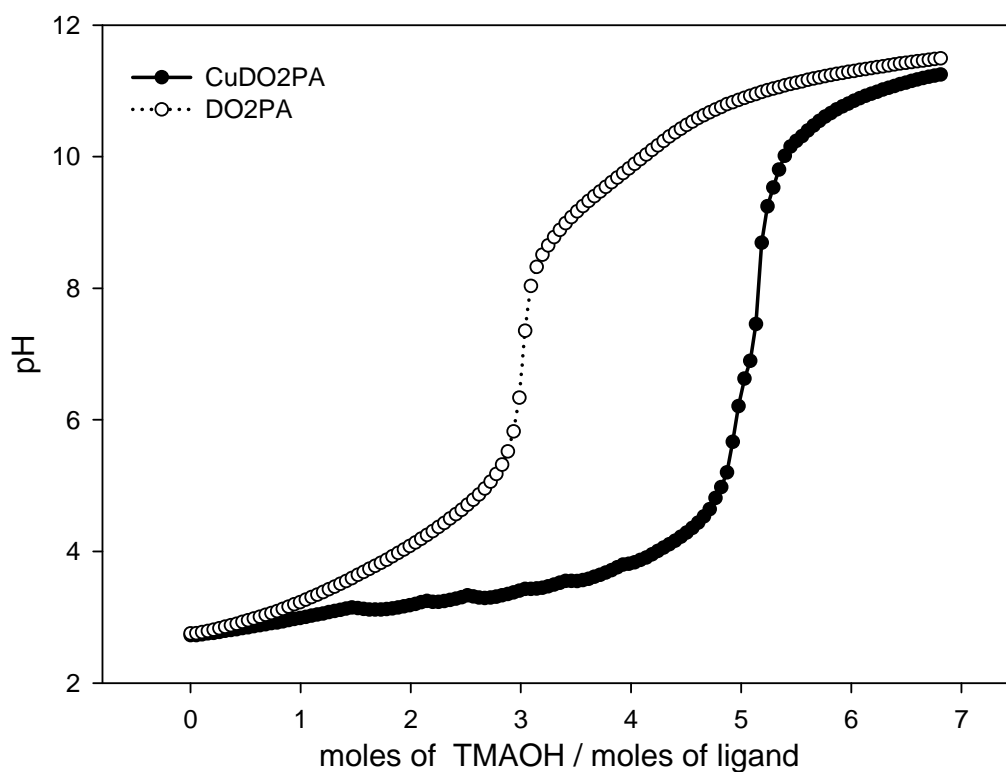


圖 4-1 DO2PA 以及 CuDO2PA 之酸鹼滴定圖

將滴定 CuDO2PA 的第二個反曲點減去滴定 DO2PA 的第二個反曲點，也就是五當量減去三當量，再乘以鹼液的濃度，即為較正確的 DO2PA 濃度。

(例) DO2PA (aq)濃度計算：

DO2PA 在滴定了 0.0573 ml TMAOH，產生反曲點。CuDO2PA 則在滴定了 0.0983 ml TMAOH，產生反曲點。

根據錯合的原理，推測兩者反曲點之間相差 2 個當量的 H^+ 。

標定之 TMAOH(aq)=0.5013 M

$(0.0983 - 0.0573) \times 0.5013 = 2 \times [DO2PA(aq)]$

$[DO2PA(aq)] = 10.2767 \text{ mM}$

將此濃度乘以五減去滴定 CuDO2PA 的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約為 2.8 左右，重新推算 DO2PA 的組成，也與元素分析的結果有一致性。

* 配位子質子化常數之滴定原理⁶⁵

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：



因為 $K_{H_iL}^H$ ($i=1,2,3,\dots,n$) 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：

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

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：

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

$$= \frac{[HL] + 2[H_2L] + 3[H_3L] + \dots + n[H_nL]}{[L] + [HL] + [H_2L] + \dots + [H_nL]}$$

$$= \frac{\sum_{i=1}^n i[H_i L]}{\sum_{i=0}^n [H_i L]} = \frac{\sum_{i=1}^n i K_{H_i L}^H [H]^i}{\sum_{i=0}^n K_{H_i L}^H [H]^i} \quad \text{where } K_{H_0 L}^H = 1 \quad \text{式 (5.)}$$

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：

$$[H]_t = \sum i[H_i L] + [H^+] - [OH^-] \quad \text{式 (6.)}$$

$\sum i[H_i L]$ ：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：

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

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

根據式 (6.)、式 (7.) 可得：

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

將式 (8.) 除上配位子總濃度後，得到平均質子數 h ：

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

若取half-integral a值（mole of base / mole of ligand）為 $K_{H_nL}^H$ 值，代入式（5.）便可

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

* 配位子 DO2PA 之質子化常數

使用的計算軟體是 1988 年 A. E. Martell 發表的 PKAS 程式⁶⁵。將 DO2PA 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 DO2PA 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 (LogKi)。

表 4-1 不同配位子之質子化常數

	DOTA ⁴⁹	DO3A ⁴⁹	DO2A ⁴⁹	DO2PA	ODO2A ⁵¹	Cyclen ⁵⁰
LogK ₁	11.34	10.72	10.94	11.09±0.26	10.88	10.6
LogK ₂	9.90	9.51	9.55	9.29±0.13	5.96	9.6
LogK ₃	4.60	4.40	3.85	4.60±0.08	2.85	1.5
LogK ₄	4.00	3.39	2.55	3.31±0.08	1.86	0.7
LogK ₅				1.73±0.28	1.24	

根據實驗室之前對於 DO2A 的研究⁴⁹，推測前兩個質子化的位置為大環上的二級氮，最後兩個是在乙酸基上。因此推測 DO2PA 前兩個質子化位置在大環上

二級氮上的位置，主要是因為二級氮的鹼度高於三級氮，除此之外，二級氮不似三級氮上還有丙酸根的立體障礙效應。但是進一步的質子化順序還是需要利用 ^1H NMR 來鑑定，藉由觀察不同 pH 值下，各個氫原子的波峰的漂移來定出質子化的順序。

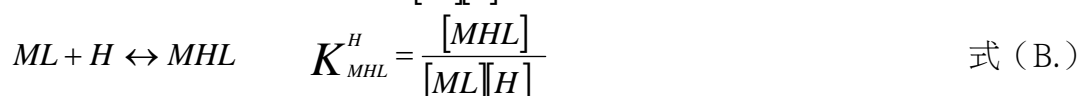
由表 4-1 可得知不同配位子的質子化常數的比較，可以發現 LogK_1 的變化由 cyclen 的 10.6 提升至 10.72-11.34 可見羧酸基對於 LogK_1 的提升有影響，但是官能基的數目及官能基碳鏈的長短對於 LogK_2 事實上沒有顯著的影響。此外，DO2PA 與 DO2A 最大的差異在 LogK_3 、 LogK_4 ，發現 DO2PA 之值 $>$ DO2A 之值；在總鹼度的部份 DO2PA $>$ DO2A。



第五章 配位子 DO2PA 與金屬陽離子穩定常數之研究

*配位子與金屬陽離子之穩定常數計算原理

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)

$$\begin{aligned} [L]_t &= [L] + [HL] + [H_2L] + \cdots + [H_nL] + [MHL] + [ML] \\ &= (1 + K_1[H] + K_1K_2[H]^2 + K_1K_2K_3[H]^3 + \cdots + K_1K_2K_3 \cdots K_n[H]^n) [L] + (K_{MHL}^H[H] + 1) [ML] \\ &= A_1[L] + X_1[ML] \end{aligned} \quad \text{式 (C.)}$$

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

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

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

$$[M]_t = [ML] + [MHL] + [M] = [ML]X_1 + [M] \quad \text{式 (D.)}$$

$[H]_t$ ：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

$$[H]_t = \frac{n[L]_t - b}{V} \quad \text{式 (8.)}$$

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

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

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

$$= A_2[L] + X_2[ML] - [OH^-] \quad \text{式 (E.)}$$

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

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

$[L]_t$ 、 $[M]_t$ 、 $[H]_t$ 、 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 (A. ~ E.) 求得。

* 配位子 DO2PA 與金屬陽離子之穩定常數

1. 滴定之實驗方法：

配體積 5 ml，配位子濃度 2.0 mM，金屬陽離子濃度 2.0 mM (過量 5%)， $\mu=0.10$

M 之滴定溶液：

計算後取適量標定過已知濃度 DO2PA_(aq)、金屬陽離子溶液、TMACl_(aq)，補足二次水達 5.0 ml，控制溫度在 25.0±0.1 °C，攪拌子攪拌平衡，並以 TMAOH_(aq) 滴定之。

TiNet 設定為

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

$V_{\text{stop}} = 0.13\text{ml}$ (先估算超過配位子6.5倍的當量)

signal Drift = 1 mv/min

equilibrium time = 200 s

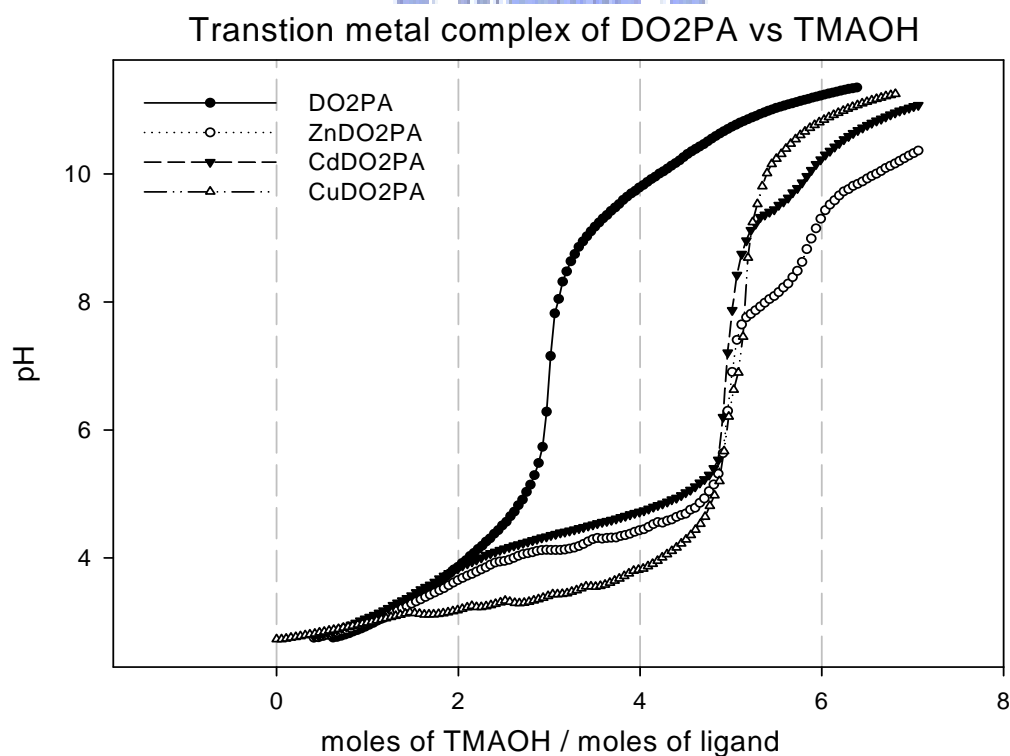
會在約5個當量TMAOH_(aq)體積，產生一個反曲點。

2.穩定常數之計算：

使用的軟體為 1988 年 A. E. Martell 發表的 BEST 程式。將 DO2PA 與金屬陽離子滴定的結果輸出，以 MS Excel 處理成 BEST 所需要的格式去運算。DO2PA 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 ($\text{Log } K_{\text{ML}}$)。



3.實驗結果：



LogK _{ML}	DOTA	DO3A ⁵³	DO2A ⁴⁹	DO2PA
La³⁺	22.9	19.7	10.94±0.14	—
Ce³⁺	23.4	—	11.31±0.03	nm
Pr³⁺	23.0	—	12.00±0.10	—
Nd³⁺	23.0	—	12.56±0.10	—
Sm³⁺	23.0	—	12.93±0.01	—
Eu³⁺	23.5	—	12.99±0.12	nm
Gd³⁺	24.7	21.0	13.06±0.04	—
Tb³⁺	24.2	—	12.93±0.01	—
Dy³⁺	24.8	—	13.13±0.05	—
Ho³⁺	24.5	—	13.00±0.04	—
Er³⁺	24.4	—	13.31±0.02	—
Tm³⁺	24.4	—	13.19±0.11	—
Yb³⁺	25.0	23.0	13.26±0.15	nm
Lu³⁺	25.4	—	13.16±0.18	—
Cu²⁺	22.63	22.87±0.03	—	19.59±0.04
Zn²⁺	21.05	19.26±0.05	—	16.36±0.10
Cd²⁺	—	—	—	15.45±0.05
Ni²⁺	—	—	—	nm

表 5-1 DO2PA 與過渡金屬形成錯合物之穩定常數⁵² (nm：not measurable)

我們將 DO2PA 與鑰系金屬中的 Ce³⁺、Eu³⁺、Yb³⁺ 以及過渡金屬中的 Cu²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺、Ni²⁺ 來進行錯合，發現 DO2PA 與金屬錯合的能力並不是很好，所以在取得足夠數據來分析穩定常數前，金屬離子就發生水解反應並且形成氫氧化合物的沉澱，特別是在鑰系金屬離子的部份。表 5-1 中的配位子都是以 cyclen 為主體，但

是因為官能基數目的不同和官能基的不同，對於錯合物的穩定度之貢獻也因此而有所差別；以酸基來說，增加酸基官能基的數目可以提高金屬錯合物的穩定度。一般來說，金屬離子會先與酸基上的氧配位後，再進一步進入大環環穴中與氮原子配位。根據 Mrow 在 1993 年合成了 1,4,7,10-tetrakis(2-carbamoyl-ethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane⁵⁴，其四個官能基為丙醯胺基，並進行其 La 金屬錯合物之結構與動力學的相關研究，發現此配位子與 La^{3+} 的配位鍵結很弱，在中性 pH 值、37°C 下就會解離，另外根據 X-ray 繞射的結果，得知錯合物中大環氮原子所形成的環穴不足以容納 La^{3+} ，因此 La^{3+} 是靠四個丙醯胺基摺疊與氧配位座落在環穴上方。因此，推測 DO2PA 錯合能力不好的原因為加長酸基碳鏈導致大環本身更堅固(rigid)，所形成的環穴不足以容納鑰系金屬，再加上只有兩個丙酸基的配位作用，所以無法形成穩定的錯合物。

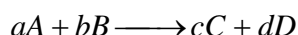


第六章 LnHEDTA 之動力學研究

*反應動力學之實驗原理

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，維持反應環境。利用合適的測量方法測定反應物的濃度減少或增加量與時間的函數關係。藉由這些濃度與時間的數據，可推導出反應動力關係式；而在不同溫度下重複實驗，亦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居多。以下列反應為例：



$$R = -\frac{d[A]}{dt} = k_n [A]^{m_1} [B]^{m_2}$$

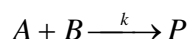
此反應系的反應速率對反應物 A 而言為 m_1 級 (m_1 order)，對反應物 B 而言為 m_2 級 (m_2 order)，則此反應之總級數 $n = m_1 + m_2$ 。 m_1 及 m_2 是藉由實驗所決定，與反應物的係數 a 與 b 無關。

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

改變 A 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 B 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 。

假一級反應常數的測定：

假設 LnHEDTA 水解 BNPP，是一個簡單的不可逆反應，亦即一當量 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：

$$R = -\frac{d[A]}{dt} = k[A][B]$$

此反應對反應物 A 或 B 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：

$$R = -\frac{d[B]}{dt} = k_{obs}[B]$$

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

*LnHEDTA 反應動力學之實驗方法

◎溶液的配製：

1. LnHEDTA 溶液的配製：

將標定過的 $\text{Ln}^{3+}_{(aq)}$ （方法見第三章）與 $\text{HEDTA}_{(aq)}$ 依所需 $\text{LnHEDTA}_{(aq)}$ 濃度，計算取量，以 1：1.02（過量 2%）莫耳數的比例混合，以確保 LnHEDTA 能完全錯合，不會有多餘的 Ln^{3+} 影響 BNPP 的水解。再將兩者混合好的水溶液，緩緩滴入適量的 $\text{TMAOH}_{(aq)}$ （濃度視情況而定），調整 $\text{LnHEDTA}_{(aq)}$ 的 pH 值，當 Ln^{3+} 與 HEDTA 完全錯合後，pH 值應該在反曲點附近，因此每個 LnHEDTA 所該錯合達到的 pH 值決定於其滴定曲線，大約都在 pH=6 左右。錯合完成後，pH 值應該會穩定，不會再降低，整個錯合的時間約在 12 小時內，若加溫，則可以加快錯合速率。達穩定錯合 pH 值的金屬錯合溶液加入定量瓶中，以二次水補足，達到所需的 $\text{LnHEDTA}_{(aq)}$ 濃度。

2. TMACl（tetramethylammonium chloride， $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ ）溶液的配製：

為離子強度劑，配製方法如第四章所述。

3. 緩衝溶液的配製：

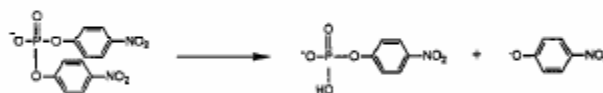
選用的弱酸包含：

MPS_(s) (3-Morpholinopropane sulfonic acid , $pK_a=7.2$) 、 TAPS_(s) (3-[Tris(hydroxymethyl)methylamino]-1-propanesulfonic acid , $pK_a=8.4$) 、 CHES_(s) (2-[N-Cyclohexylamino]-ethanesulfonic acid , $pK_a=9.3$) 、 CAPS_(s) (3-[Cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid , $pK_a=10.4$) 、 CABS_(s) (4-[Cyclohexylamino]-1-butanefulfonic acid , $pK_a=10.7$) 。 根據 Henderson-Hasselbalch equation , 加入 TMAOH_(aq) , 配製 200 mM 、 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 。

4. BNPP (bis(*p*-nitrophenyl) phosphate sodium salt) 溶液的配製：

取用保存良好的 BNPP_(s) (SIGMA , total impurities <0.05% free *p*-nitrophenol) 配製濃度為 20 mM 的 BNPP_(aq) 。

在動力學實驗上，我們以 BNPP 作為磷酸雙酯鍵的異構物，因為 BNPP 被水解之後在 400 nm (*p*-nitrophenolate 的 $\lambda_{max}=400$ nm) 的波長會有吸光，偵測吸光值，可以計算水解的動力學效力。



【圖 5-1】BNPP 水解產生 *p*-nitrophenolate

*動力學實驗步驟：

1. 先將所需的比色管備妥 (依據所需的測量的波長範圍，若是需要觀測紫外光區則使用石英比色管，若是觀測可見光區則用塑膠比色管) ，加入二次水，以 Agilent HP 8453 UV-Visible Spectrophotometer 測定 blank 及操作 zero cell，依序晾乾比色管備用，以 Agilent HP UV-Visible ChemStation Software 處理實驗數據，先設定好吸光波長、實驗時間、檔案名稱等。
2. 在根據濃度計算體積，在各個比色管中依序加入：二次水、離子強度劑 TMACl

(aq)、LnHEDTA (aq)、BNPP (aq)，最後再加入緩衝溶液。

動力學實驗需要維持各個實驗組的離子強度，因此需要加入離子強度劑 TMACl (aq)。

以配製 10 mM EuHEDTA、 μ 0.10 M、BNPP 0.10mM、100.0mM pH

10.5 緩衝液之動力學反應溶液 1.0 ml 為例，離子強度的計算方法：

10.0 mM EuHEDTA 產生的離子強度： μ 0.03 M

100.0 mM pH 10.5 CAPS 緩衝液，根據 Henderson-Hasselbalch equation，

$$10.5 = 10.4 + \log \frac{[CAPS^-]}{[CAPS]}, \frac{[CAPS^-]}{[CAPS]} = 1.2589$$

$$\text{所以緩衝液產生的離子強度: } \mu (-1)^2 \times \frac{1.2589}{2.2589} \times 0.1 = 0.05573 \text{ M}$$

所需的 2.0 M TMACl (aq) 的體積：

$$\frac{(0.10 - 0.03 - 0.05573)}{2} \times 1000 = 7.135 \mu\text{l}$$

3. 混合配好的動力學實驗反應溶液，比色管置入 Agilent HP 8453 UV-Visible Spectrophotometer，蓋上蓋子，開始隨時間監測吸光值。實驗結束後將檔案及數據輸出處理。

*LnHEDTA 動力學實驗結果

I. LnHEDTA 在不同 pH 值下水解 BNPP

水解 BNPP 的實驗，是觀察 *p*-nitrophenolate 的濃度變化，因此可以藉由

p-nitrophenolate 在 400nm 之吸光值來決定 LnONO₂A⁺水解反應速率。

$$A = \epsilon bc \quad \text{Rate} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\frac{\Delta A}{\epsilon}}{\Delta t} = \frac{\text{slope}}{\epsilon} \quad \text{when } b = 1\text{cm}$$

p-nitrophenolate 的 λ_{\max} =400 nm， ϵ =18.7×10³ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹。根據假一次反應

(pseudo-first-order reaction)，可以求得 k_{obs} 。

$$\text{Rate} = k_{\text{obs}} [BNPP] \quad k_{\text{obs}} = \frac{\text{slope}}{\epsilon [BNPP]}$$

表 6-1 所列即是 LnHEDTA 在不同 pH 值下計算所得的 k_{obs} ；圖 6-1 為 LnHEDTA k_{obs}

vs pH 的做圖。

表 6-1 Observed BNPP Hydrolysis Rate Constant vs pH by LnHEDTA

CeHEDTA		PrHEDTA		NdHEDTA		SmHEDTA		EuHEDTA	
pH	kobs	pH	kobs	pH	kobs	pH	kobs	pH	kobs
8.48	4.69E-06	8.49	7.54E-07	8.47	5.91E-07	8.47	2.57E-06	8.99	3.29E-06
8.97	6.11E-06	9.00	8.80E-07	8.98	9.08E-07	8.99	6.53E-06	9.49	6.17E-06
9.45	1.54E-05	9.50	2.54E-06	9.47	1.84E-06	9.48	1.22E-05	9.95	2.03E-05
9.89	7.42E-05	9.99	6.93E-06	9.94	4.59E-06	9.96	2.22E-05	10.42	3.11E-05
10.36	1.88E-04	10.46	9.96E-06	10.44	1.03E-05	10.37	3.08E-05	10.92	4.15E-05
10.85	2.31E-04	10.92	1.13E-05	10.92	1.11E-05	10.87	4.30E-05	11.34	4.19E-05

GdHEDTA		TbHEDTA		DyHEDTA		HoHEDTA		ErHEDTA	
pH	kobs	pH	kobs	pH	kobs	pH	kobs	pH	kobs
8.47	3.11E-07	6.96	6.96E-08	7.49	2.78E-07	6.96	6.93E-07	7.49	4.65E-07
8.98	1.08E-06	7.46	2.54E-07	7.97	5.21E-07	7.51	4.34E-06	7.97	1.50E-06
9.48	4.46E-06	7.98	2.24E-07	8.46	1.41E-06	7.99	1.44E-06	8.45	2.41E-06
9.96	1.71E-05	8.46	3.31E-06	8.95	3.91E-06	8.45	8.68E-06	8.93	4.04E-06
10.45	3.21E-05	8.96	1.24E-05	9.43	6.47E-06	8.93	1.88E-05	9.42	4.86E-06
10.91	4.08E-05	9.46	1.78E-05	9.87	7.06E-06	9.43	1.76E-05	9.90	5.38E-06
		9.91	2.16E-05	10.40	8.95E-06	9.88	2.05E-05	10.42	5.25E-06
		10.36	2.20E-05	10.89	8.39E-06	10.38	1.10E-05	10.91	5.06E-06
		10.90	2.55E-05			10.89	1.07E-05		

YbHEDTA		LuHEDTA	
pH	kobs	pH	kobs
7.52	1.17E-06	8.45	2.59E-06
8.01	2.33E-06	8.91	3.46E-06
8.48	3.41E-06	9.42	4.56E-06
8.89	4.33E-06	9.86	5.13E-06
9.40	4.74E-06	10.35	5.13E-06
9.79	5.38E-06	10.88	4.52E-06
10.31	5.61E-06		
10.78	5.36E-06		

[LnHEDTA]=10mM , [buffer]=100mM , [BNPP]=0.1mM , μ =0.1M , T=25.0±0.1°C

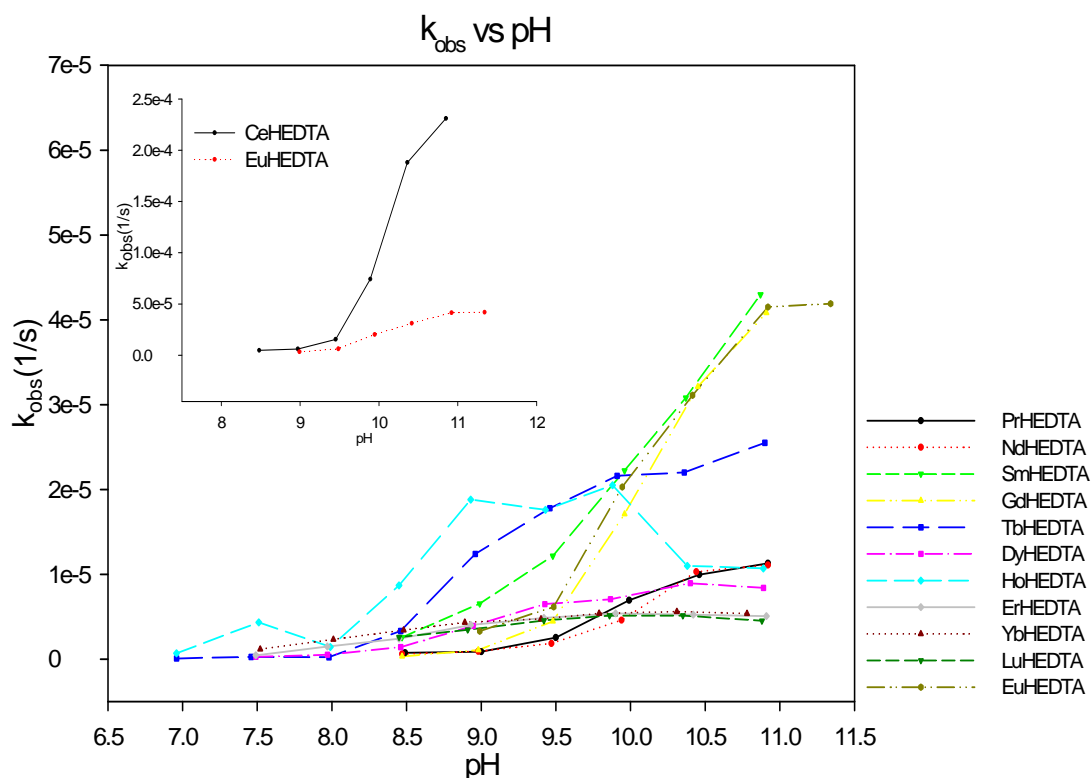


圖 6-1 Observed BNPP Hydrolysis Rate Constant vs pH by LnHEDTA
 $[LnHEDTA]=10\text{mM}$, $[BNPP]=0.1\text{mM}$, $[buffer]=100\text{mM}$ (MPS pH7.0、pH7.5；TAPS pH 8.0、pH8.5；CHES pH 9.0、pH 9.5；CAPS pH 10.0、pH 10.5；CABS pH 11.0) , $\mu=0.1\text{M}$

我們發現 LnHEDTA 水解 BNPP 的 k_{obs} 會隨著 pH 值的上升而增加，根據先前的研究已經明顯的指出這個上升的趨勢並不是因為 $[OH^-]$ 增加或者是緩衝溶液的影響³⁴。

接著我們將每個 pH 值下 LnHEDTA 水解 BNPP 的 k_{obs} 、LnHEDTA 之濃度等相關數據，利用兩種方法(方法一： k_{obs} vs pH 做圖並且套入公式 方法二： k_{obs} vs $[H^+]$ 做圖並套入公式)，代入下列的公式(2)：

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

$$k_{obs} = k_{LnL(OH)}[LnL(OH)]$$

$$K_h = [LnL(OH)][H^+] / [LnL(H_2O)]$$

$$[LnL]_t = [LnL(H_2O)] + [LnL(OH)]$$

$$K_{obs} = \frac{k_{LnL(OH)} K_h [LnL]_t}{K_h + [H^+]}$$

公式(2)

得到 K_h (The coordinated water hydrolysis constant of $\text{LnL}(\text{H}_2\text{O})$)及 $k_{\text{LnL}(\text{OH})}$ (The apparent rate constant due to $\text{LnL}(\text{OH})$)，結果見表6-2、表6-3。

表 6-2 方法一：Fitted K_h and $k_{\text{LnL}(\text{OH})}$ for BNPP Hydrolysis by LnHEDTA

	$k_{\text{LnL}(\text{OH})}$	K_h	$\text{p}K_h$	R_{sqr}
CeHEDTA	$2.12(\pm 0.35)\text{E-}2$	$8.71(\pm 184)\text{E-}11$	10.06 ± 1.33	0.943
PrHEDTA	$1.14(\pm 0.07)\text{E-}5$	$1.41(\pm 8.84)\text{E-}10$	9.85 ± 0.8	0.990
NdHEDTA	$1.11(\pm 0.11)\text{E-}3$	$1.12(\pm 13)\text{E-}10$	9.95 ± 1.06	0.974
SmHEDTA	$4.06(\pm 0.25)\text{E-}3$	$1.55(\pm 9.05)\text{E-}10$	9.81 ± 0.77	0.982
EuHEDTA	$3.64(\pm 0.39)\text{E-}3$	$1.33(\pm 22.4)\text{E-}10$	9.88 ± 1.23	0.971
GdHEDTA	$3.35(\pm 0.53)\text{E-}3$	$1.29(\pm 22.4)\text{E-}10$	9.89 ± 1.24	0.943
TbHEDTA	$2.54(\pm 0.08)\text{E-}3$	$7.85(\pm 0.09)\text{E-}10$	9.10 ± 0.01	0.994
DyHEDTA	$9.11(\pm 0.30)\text{E-}4$	$7.65(\pm 6.72)\text{E-}10$	9.12 ± 0.05	0.989
HoHEDTA	$2.17(\pm 0.19)\text{E-}3$	$2.81(\pm 2.96)\text{E-}9$	8.55 ± 0.02	0.973
ErHEDTA	$5.43(\pm 0.10)\text{E-}4$	$3.33(\pm 0.79)\text{E-}9$	8.48 ± 0.62	0.994
TmHEDTA	$6.26(\pm 0.03)\text{E-}4$	$5.83(\pm 1.22)\text{E-}9$	8.23 ± 0.68	0.990
YbHEDTA	$5.34(\pm 0.12)\text{E-}4$	$7.00(\pm 1.73)\text{E-}9$	8.15 ± 0.61	0.998
LuHEDTA	$5.21(\pm 0.13)\text{E-}4$	$3.08(\pm 1.58)\text{E-}9$	8.51 ± 0.29	0.999

表 6-3 方法二：Fitted K_h and $k_{LnL(OH)}$ for BNPP Hydrolysis by LnHEDTA

	$k_{LnL(OH)}$	K_h	pK_h	R_{sq}
CeHEDTA	2.55(± 0.40)E-2	8.98(± 0.19)E-11	10.05 ± 0.32	0.970
PrHEDTA	1.08(± 0.13)E-5	2.34(± 4.92)E-10	9.63 ± 0.32	0.974
NdHEDTA	1.07(± 0.17)E-3	1.89(± 3.07)E-10	9.72 ± 0.21	0.954
SmHEDTA	3.91(± 0.42)E-3	2.21(± 5.83)E-10	9.66 ± 0.39	0.980
EuHEDTA	4.63(± 0.19)E-3	7.60(± 48.2)E-11	10.12 ± 0.8	0.997
GdHEDTA	4.91(± 0.33)E-3	6.06(± 30.5)E-11	10.22 ± 0.7	0.995
TbHEDTA	2.47(± 0.09)E-3	8.64(± 0.5)E-10	9.06 ± 0.75	0.994
DyHEDTA	8.72(± 0.28)E-4	9.20(± 61.0)E-10	9.04 ± 0.83	0.996
HoHEDTA	1.50(± 0.23)E-3	1.11(± 1.20)E-9	7.95 ± 0.03	0.893
ErHEDTA	5.31(± 0.11)E-4	3.55(± 32.2)E-9	8.45 ± 0.96	0.998
TmHEDTA	6.26(± 0.03)E-4	5.81(± 87.3)E-9	8.24 ± 1.18	0.990
YbHEDTA	5.26(± 0.14)E-4	8.17(± 51.7)E-9	8.09 ± 0.8	0.997
LuHEDTA	5.14(± 0.15)E-4	3.38(± 20.2)E-9	8.47 ± 0.78	0.998

表 6-3 LnHEDTA 與鑷系金屬的水解常數

	方法一	方法二	文獻 ⁵⁶	pK _h ⁵⁵	
CeHEDTA	10.06	10.05	—	Ce ³⁺	
LaHEDTA	—	—	10.31	La ³⁺	9.14
PrHEDTA	9.85	9.63	10.08	Pr ³⁺	8.63
NdHEDTA	9.95	9.72	10.18	Nd ³⁺	8.51
SmHEDTA	9.81	9.66	10.07	Sm ³⁺	8.42
EuHEDTA	9.88	10.12	9.74	Eu ³⁺	8.39
GdHEDTA	9.89	10.22	9.79	Gd ³⁺	8.43
TbHEDTA	9.1	9.06	9.25	Tb ³⁺	8.24
DyHEDTA	9.12	9.04	8.89	Dy ³⁺	8.18
HoHEDTA	8.55	7.95	8.65	Ho ³⁺	8.12
ErHEDTA	8.48	8.45	8.63	Er ³⁺	8.07
TmHEDTA	8.23	8.24	8.66	Tm ³⁺	8.03
YbHEDTA	8.15	8.09	8.56	Yb ³⁺	8
LuHEDTA	8.51	8.47	8.64	Lu ³⁺	7.98

註：文獻 55 是利用電位滴定法所訂出的 pK_h；文獻 56 是利用 Polarographic Method

首先來觀察 pK_h的結果，我們發現 pK_h會隨著原子序的增加而減小，另外將其與 Ln³⁺之 pK_h來比較，進一步發現隨著原子序的增加 LnHEDTA 之 pK_h和 Ln³⁺的 pK_h的差值越小(見表 6-3 與圖 6-2)。就鑷系金屬本身來說，其離子半徑會隨著原子序的增加而減小，相對的其電荷密度就會增加，接著再與 HEDTA 形成錯合物後，整個錯合物的電荷密度就會跟著有所變化。根據數據我們可以知道形成錯合物後，配位子 HEDTA 對於電荷密度影響會隨著原子序的增加而減少。再來，方法一所得到的水解常數與文獻的趨勢較相似，可以很明顯的看到鑷系金屬特有的” gadolinium break” ，雖然在方法二的結果上也可以看到這樣的現象，但是在 Pr 至 Sm 的這個區間有明顯的下降，回到 Rsqr 值(Pr : 0.974、Nd : 0.954、Sm : 0.980)來看，這個區間的 Rsqr 相對於其餘的 fitting 結果來說低了許多，所以誤差也比較大，另外在 HoHEDTA 的部份也可以看見相同的情況。

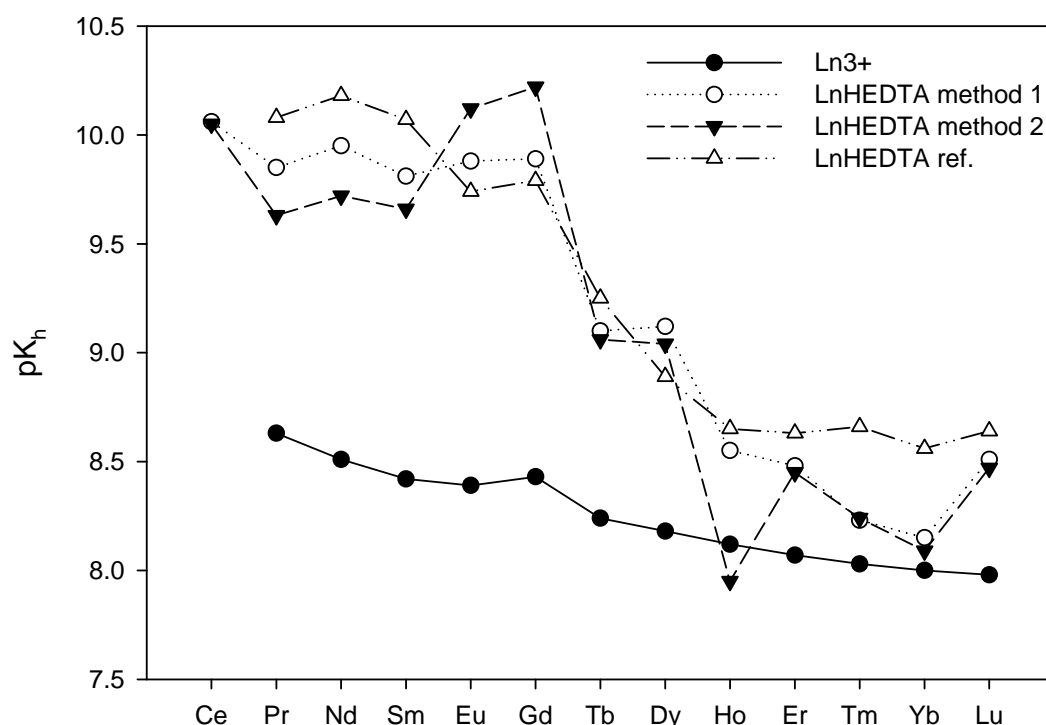


圖 6-2 LnHEDTA 與 Ln^{3+} 之水解常數與離子半徑關係圖

在 $k_{\text{LnL(OH)}}$ 的結果部份(見表 6-4 與圖 6-3), 我們發現 CeHEDTA 之 $k_{\text{LnL(OH)}}$ 遠大於其他鑰系金屬錯合物, 根據 Komiyama 及 Chin 等團隊的研究發現⁵⁷⁻⁵⁹, Ce^{3+} 可以在 $\text{pH}=8.2$ 、 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 Ce^{3+} 就失去了水解能力, 故 Chin 推測 Ce^{3+} 必須被空氣中的氧分子氧化成 Ce^{4+} 後, 才會具有水解 dApdA 的能力。接著 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 $[\text{Ce(OH)(OH}_2)_x]^{3+}$ 為最主要的催化活性物種。因此, 我們推測 CeHEDTA 水解 BNPP 的反應異於其他 LnHEDTA, 可能與上述的原因有關, 這部份在後面會有進一步的討論。

表 6-4 方法一與方法二 fitting 之 $k_{LnL(OH)}$ 比較

$k_{LnL(OH)} (s^{-1})$	方法一	方法二
CeHEDTA	$2.12(\pm 0.35)E-2$	$2.55(\pm 0.40)E-2$
PrHEDTA	$1.14(\pm 0.07)E-5$	$1.08(\pm 0.13)E-5$
NdHEDTA	$1.11(\pm 0.11)E-3$	$1.07(\pm 0.17)E-3$
SmHEDTA	$4.06(\pm 0.25)E-3$	$3.91(\pm 0.42)E-3$
EuHEDTA	$3.64(\pm 0.39)E-3$	$4.63(\pm 0.19)E-3$
GdHEDTA	$3.35(\pm 0.53)E-3$	$4.91(\pm 0.33)E-3$
TbHEDTA	$2.54(\pm 0.08)E-3$	$2.47(\pm 0.09)E-3$
DyHEDTA	$9.11(\pm 0.30)E-4$	$8.72(\pm 0.28)E-4$
HoHEDTA	$2.17(\pm 0.19)E-3$	$1.50(\pm 0.23)E-3$
ErHEDTA	$5.43(\pm 0.10)E-4$	$5.31(\pm 0.11)E-4$
TmHEDTA	$6.26(\pm 0.03)E-4$	$6.26(\pm 0.03)E-4$
YbHEDTA	$5.34(\pm 0.12)E-4$	$5.26(\pm 0.14)E-4$
LuHEDTA	$5.21(\pm 0.13)E-4$	$5.14(\pm 0.15)E-4$

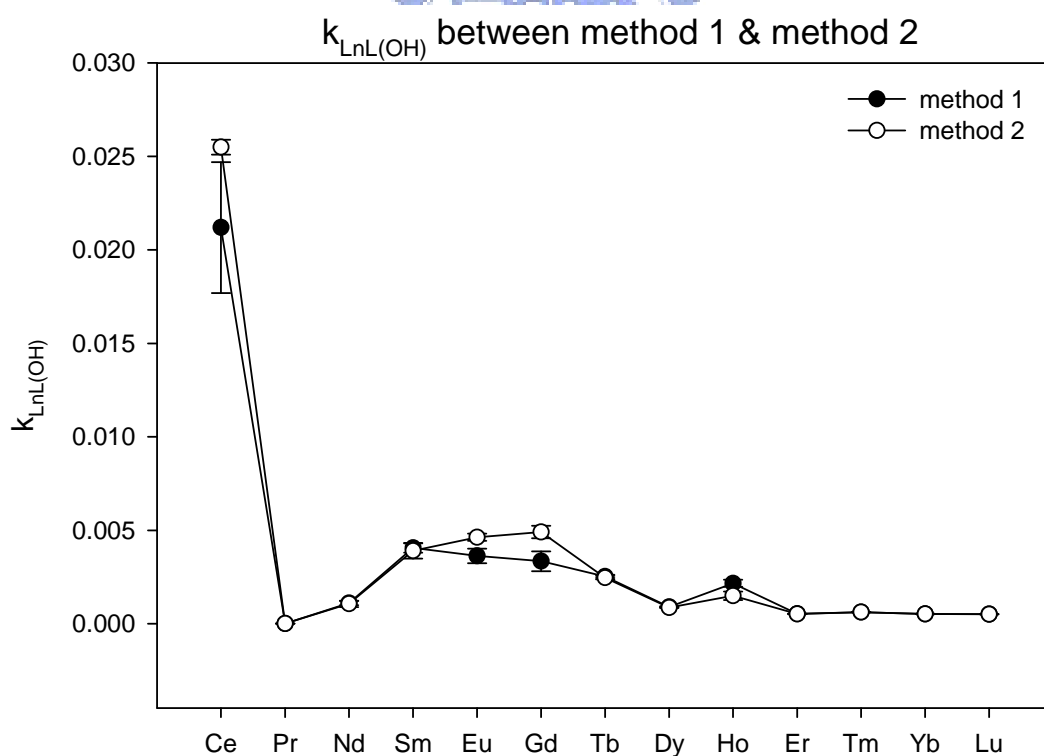


圖 6-3 方法一與方法二所得到 $k_{LnL(OH)}$ 的比較

除了 CeHEDTA 之外的 LnHEDTA，可以看到 k_{obs} 從 PrHEDTA 漸漸增加至 SmHEDTA、EuHEDTA、GdHEDTA 後開始就減小，到 HoHEDTA 又跳起來，接著就又減小。目前已知水解的速率與電荷密度、配位水的數目、配位水的位向有關。電荷密度越大、配位水越多，水解速率越快。之前吳柏宏學長利用 LnDO_2A^+ ($\text{Ln}=\text{La}, \text{Eu}, \text{Yb}$) 來水解 BNPP，發現擁有最高電荷密度的 YbDO_2A^+ 的水解速率卻是三者間最慢的，間接證明了 Yb^{3+} 因為離子半徑較小而較深入環穴中，使得配位水所在的位置之立體障礙增加，而沒有足夠的空間容納配位水，導致其配位水的數目少於三個；同樣的道理，HEDTA 與 DO₂A 皆為六配位，與鑰系金屬錯合後理應會帶有三個配位水，原子序越大，電荷密度越大，水解速率越快，從實驗結果來看，在 GdHEDTA 之後水解速率就降低了，可能就是因為立體結構的差異導致配位水的數目減少了，未來我們可以進一步利用 laser 光譜學的方式，計算出配位水的數目，來證實我們的推測。此外，值得注意的是 HoHEDTA， k_{obs} 有明顯的升高，這部分在後續的實驗會有進一步討論。



II. LnHEDTA(Ln=Ce,Nd,Eu,Dy,Er) 水解 BNPP 之 BNPP 濃度效應

此實驗主要是要觀察 LnHEDTA 切割 BNPP 時，BNPP 之反應級數是否為 1。
實驗條件為[LnHEDTA]=10mM、[buffer]=100mM、[BNPP]=0.1mM~1.6mM、
pH=10.5、T=25°C，所得結果如下：

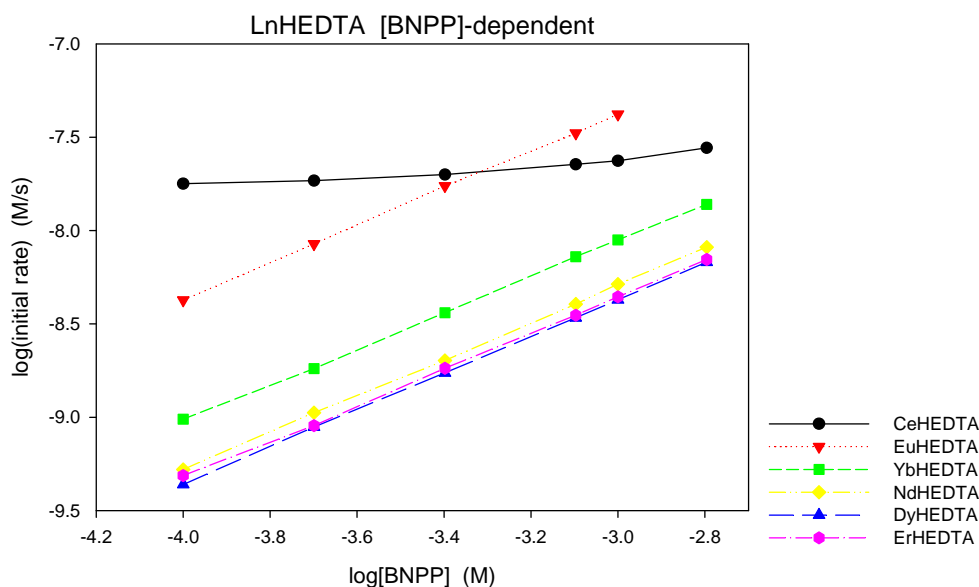


圖 6-4 LnHEDTA 水解 BNPP，BNPP 的級數直線回歸圖

complex	BNPP 的 order	Rsqr
CeHEDTA	0.15±0.02	0.9200
NdHEDTA	0.97±0.01	0.9998
EuHEDTA	0.99±0.01	0.9997
DyHEDTA	0.99±0.01	0.9997
ErHEDTA	0.99±0.01	0.9999
YbHEDTA	1.08±0.11	0.9890

表 6-5 LnHEDTA 水解 BNPP 之 BNPP 級數

大部分如同我們所預期的，BNPP 的級數幾乎都接近 1，唯獨 CeHEDTA 不是，而且其 BNPP 的級數幾乎接近 0，再加上先前也發現 CeHEDTA 的速率常數遠大於其他 LnHEDTA，因此我們可以得知 CeHEDTA 的催化機制跟其他 LnHEDTA 不同。之前在文中有提到 Komiyama 及 Chin 等團隊指出 Ce^{3+} 在空氣中會被氧分子氧化成 Ce^{4+} ，變成具有水解效力的物種，另外 Yatsimirsky 的團隊在 2005 年指出

³¹，以 Ce^{4+} 為主的鐳系金屬離子錯合物，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³¹。在我們配置 Ce^{3+} 水溶液與錯合 CeHEDTA 時，並不是在氮氣的狀況下進行，根據上述三個團隊的研究成果，我們可以推測可能已經有 Ce^{3+} 先氧化成 Ce^{4+} ，導致溶液中具有催化活性的物種已經不單純是 CeHEDTA 而且變的很複雜，造成其實驗結果與其他 LnHEDTA 有很大的不同，同時也由於活性物種複雜，我們目前無法進一步了解其反應機制為何。



III. LnHEDTA 水解 BNPP 之 LnHEDTA 濃度效應

表 6-6 Observed BNPP Hydrolysis Rate Constant vs [LnHEDTA]

[CeHEDTA](M) kobs	[PrHEDTA](M) kobs	[NdHEDTA](M) kobs	[SmHEDTA](M) kobs
1.47E-03 2.79E-05	8.17E-04 2.68E-06	1.56E-03 4.27E-06	6.64E-03 2.50E-05
2.93E-03 7.79E-05	1.63E-03 3.39E-06	3.12E-03 7.30E-06	8.30E-03 3.18E-05
5.87E-03 1.58E-04	3.27E-03 4.78E-06	6.24E-03 1.23E-05	1.25E-02 4.59E-05
7.34E-03 1.89E-04	6.54E-03 7.77E-06	7.80E-03 1.50E-05	1.66E-02 5.86E-05
1.10E-02 2.42E-04	8.17E-03 8.92E-06	1.17E-02 1.90E-05	2.08E-02 7.00E-05
1.47E-02 2.74E-04		1.56E-02 2.20E-05	4.15E-02 1.14E-04
		1.95E-02 3.14E-05	
		3.90E-02 4.62E-05	
[EuHEDTA](M) kobs	[GdHEDTA](M) kobs	[TbHEDTA](M) kobs	[DyHEDTA](M) kobs
1.61E-03 8.08E-06	6.42E-03 2.91E-05	7.69E-03 1.39E-05	1.92E-03 1.59E-06
3.23E-03 1.98E-05	8.03E-03 3.92E-05	9.62E-03 2.04E-05	3.84E-03 3.01E-06
6.45E-03 3.87E-05	1.20E-02 5.91E-05	1.44E-02 3.42E-05	7.68E-03 5.35E-06
8.07E-03 4.68E-05	1.61E-02 7.83E-05	1.92E-02 4.92E-05	9.60E-03 6.45E-06
2.02E-02 1.22E-04	2.01E-02 9.61E-05	2.40E-02 6.48E-05	1.44E-02 9.18E-06
4.03E-02 1.91E-04	4.01E-02 1.83E-04	4.81E-02 1.47E-04	1.92E-02 1.11E-05
[HoHEDTA](M) kobs	[ErHEDTA](M) kobs	[TmHEDTA](M) kobs	[YbHEDTA](M) kobs
7.91E-03 7.73E-06	1.98E-03 1.45E-06	1.99E-03 1.60E-06	9.96E-05 1.39E-06
9.89E-03 9.71E-06	3.96E-03 2.64E-06	3.98E-03 3.43E-06	1.99E-03 1.99E-06
1.48E-02 1.58E-05	7.92E-03 3.85E-06	7.96E-03 6.27E-06	3.98E-03 3.18E-06
1.98E-02 2.12E-05	9.91E-03 4.37E-06	9.95E-03 7.43E-06	7.96E-03 4.94E-06
2.47E-02 2.96E-05	1.49E-02 5.55E-06	1.49E-02 9.86E-06	9.96E-03 5.74E-06
4.94E-02 7.77E-05	1.98E-02 6.64E-06	1.99E-02 1.09E-05	1.49E-02 6.62E-06
			1.99E-02 7.75E-06
			2.49E-02 1.21E-05
			4.98E-02 1.84E-05
[LuHEDTA](M) kobs			
1.98E-03 2.30E-06			
3.96E-03 3.06E-06			
7.92E-03 4.53E-06			
9.90E-03 5.96E-06			
1.48E-02 7.62E-06			
1.98E-02 7.93E-06			

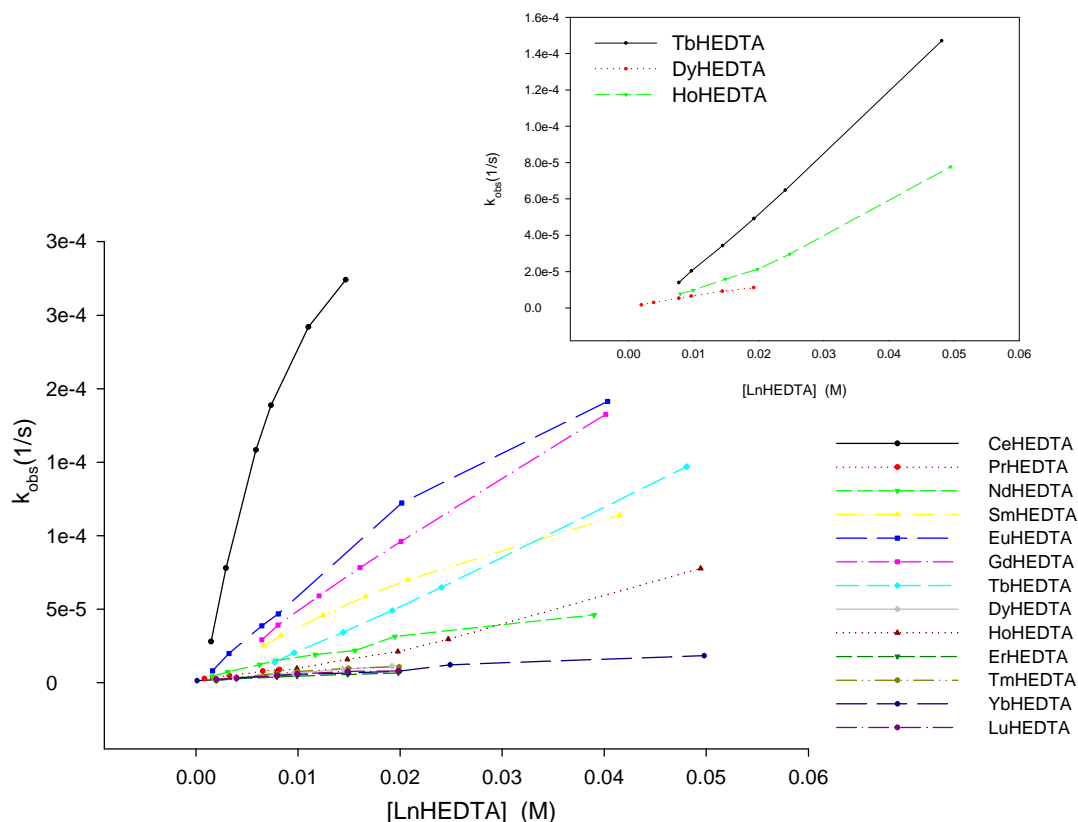
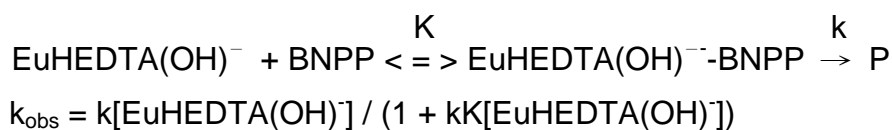


圖 6-5 Observed BNPP Hydrolysis Rate Constant vs [LnHEDTA]

[LnHEDTA]=1mM~50mM, [BNPP]=0.1mM, [buffer]=100mM (MPS pH7.0、pH7.5; TAPS pH 8.0、pH8.5; CHES pH 9.0、pH 9.5; CAPS pH 10.0、pH 10.5; CABS pH 11.0), $\mu=0.1M$

在[LnHEDTA]=1mM~50mM 之數據，是呈現簡單的飽和趨勢的曲線，除了 TbHEDTA 以及 HoHEDTA 我們發現其是呈現二次的趨勢曲線。另外仔細觀察各個曲線，會發現從 CeHEDTA 開始隨著原子序的增加，飽和趨勢會越來越不明顯，到了 TbHEDTA 以及 HoHEDTA 便變成二次趨勢曲線，接著隨著原子序的增加飽和趨勢又越來越明顯，夾在 TbHEDTA 與 HoHEDTA 之間的 DyHEDTA 因為溶解度的問題無法進行較高濃度的實驗，依據此趨勢可以推測 DyHEDTA 應該也是呈現二次趨勢曲線。除了 TbHEDTA 以及 HoHEDTA 將數據套入簡單二次式的方程式($y=y_0+ax+bX^2$)中，我們將數據套入簡單的飽和動力學反應機構中，結果如表 6-7:



k : the first order rate constant

K : the $\text{LnHEDTA}(\text{OH})^-$ -BNPP binding constant

表 6-7 Fitted k and K for BNPP Hydrolysis by LnHEDTA

	k(1/s)	K(M ⁻¹)	Rsqr
CeHEDTA	3.38(±0.38)E-2	1.53(±0.51)E+3	0.9970
PrHEDTA	2.64(±0.53)E-3	6.92(±2.97)E+4	0.9939
NdHEDTA	2.10(±0.16)E-3	9.48(±2.24)E+4	0.9961
SmHEDTA	4.28(±0.05)E-3	3.13(±0.14)E+3	0.9999
EuHEDTA	6.97(±0.52)E-3	1.61(±0.46)E+3	0.9981
GdHEDTA	5.01(±0.09)E-3	5.00(±1.14)E+2	0.9999
TbHEDTA	2.71(±0.05)E-3	—	0.9999
DyHEDTA	8.27(±0.21)E-4	2.67(±0.28)E+4	0.9998
HoHEDTA	7.33(±0.76)E-4	—	0.9998
ErHEDTA	7.71(±0.62)E-4	8.92(±1.65)E+4	0.9987
TmHEDTA	1.06(±0.08)E-3	4.23(±0.83)E+4	0.9988
YbHEDTA	5.86(±0.74)E-4	2.06(±0.91)E+4	0.9873
LuHEDTA	1.05(±0.16)E-3	7.48(±2.47)E+4	0.9956

表 6-8 The first order rate constant fitted by pH-dependent experiment and [LnHEDTA]-dependent experiment

	pH-dependent		[LnHEDTA]-dependent
	方法一 k _{LnL(OH)}	方法二 k _{LnL(OH)}	k(the first order rate constant)
CeHEDTA	2.12(±0.35)E-2	2.55(±0.40)E-2	3.38(±0.38)E-2
PrHEDTA	1.14(±0.07)E-5	1.08(±0.13)E-5	2.64(±0.53)E-3
NdHEDTA	1.11(±0.11)E-3	1.07(±0.17)E-3	2.10(±0.16)E-3
SmHEDTA	4.06(±0.25)E-3	3.91(±0.42)E-3	4.28(±0.05)E-3
EuHEDTA	3.64(±0.39)E-3	4.63(±0.19)E-3	6.97(±0.52)E-3
GdHEDTA	3.35(±0.53)E-3	4.91(±0.33)E-3	5.01(±0.09)E-3
TbHEDTA	2.54(±0.08)E-3	2.47(±0.09)E-3	2.71(±0.05)E-3
DyHEDTA	9.11(±0.30)E-4	8.72(±0.28)E-4	8.27(±0.21)E-4
HoHEDTA	2.17(±0.19)E-3	1.50(±0.23)E-3	7.33(±0.76)E-4
ErHEDTA	5.43(±0.10)E-4	5.31(±0.11)E-4	7.71(±0.62)E-4
TmHEDTA	6.26(±0.03)E-4	6.26(±0.03)E-4	1.06(±0.08)E-3
YbHEDTA	5.34(±0.12)E-4	5.26(±0.14)E-4	5.86(±0.74)E-4
LuHEDTA	5.21(±0.13)E-4	5.14(±0.15)E-4	1.05(±0.16)E-3

首先，我們來看 k (the **first order rate constant**) 的部份，和我們利用 pH-dependent 數據計算出來 $k_{LnL(OH)}$ 相符合 (見表 6-8 與圖 6-6)，經由這樣的交叉比對進一步證實了數據的正確性。在先前 pH-dependent 的實驗中，我們發現 HoHEDTA 相對於附近的錯合物其 $k_{LnL(OH)}$ 有較大的趨勢；接著在 $[LnHEDTA]$ -dependent 的實驗中，我們發現其反應是呈現二次趨勢曲線，根據之前的研究得知呈現二次趨勢曲線主要是溶液中有效的物種為雙體的錯合物，因此我們可以知道 HoHEDTA 水解速率較其鄰近的錯合物大，就是因為其產生了更具活性反應的雙體，套入公式中所得之兩個錯合物水解 BNPP 的二次數率常數 HoHEDTA 為 $1.61(\pm 0.13)E-2$ ；TbHEDTA 為 $7.77(\pm 0.89)E-3$ ，發現 HoHEDTA 兩個錯合物水解 BNPP 的 second order rate constant 為 first order rate constant 的將近 22 倍，而 TbHEDTA 兩個錯合物水解 BNPP 的 second order rate constant 僅僅只比 first order rate constant 大三倍，因此可以得知 HoHEDTA 兩個錯合物水解 BNPP 的效力遠比 TbHEDTA 的好，同時知道 TbHEDTA 在 first order rate constant 觀察不到像 HoHEDTA 顯著的變化量，原因是因為 TbHEDTA 雙個水解 BNPP 的效力並沒有顯著的比單個效力好。在所有 LnHEDTA 中，我們只發現 TbHEDTA、HoHEDTA 有這樣明顯的差異，因此可以知道 Ho 與 Tb 的錯合物相對於其他鑰系金屬的錯合物，其錯合物的結構、配位水的位向以及金屬的特性可能有助於雙體的形成，雖然形成雙體但是此雙體之水解效力仍然較 SmHEDTA、EuHEDTA、GdHEDTA 等原子序較小的金屬錯合物差。

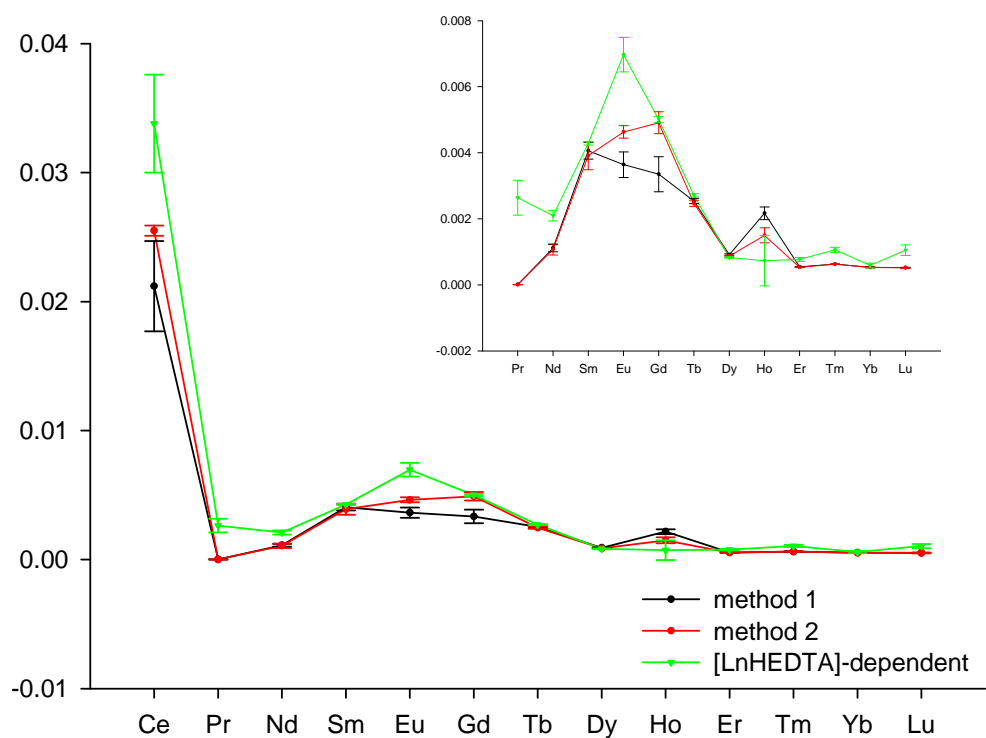


圖 6-6 Compare the first order rate constant fitted by pH-dependent experiment and [LnHEDTA]- dependent experiment

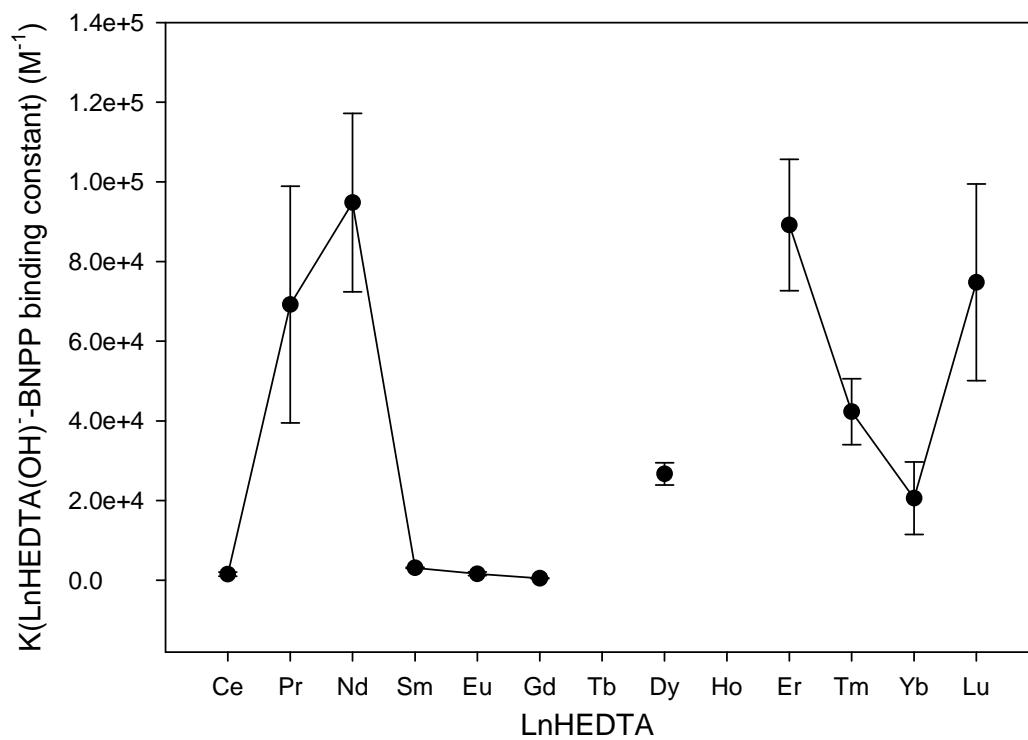


圖 6-7 $K(\text{LnHEDTA}(\text{OH})^- \text{-BNPP})$ vs LnHEDTA

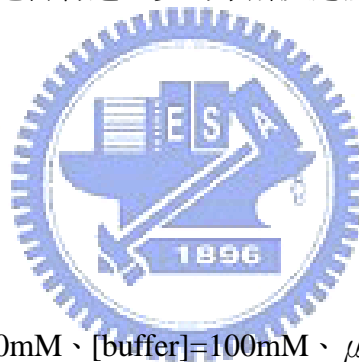
$K(\text{LnHEDTA}(\text{OH})\text{-BNPP binding constant})$ 的部份，在原子序大的其 K 值較大，因為電荷密度大的緣故；在原子序較小的 PrHEDTA 、 NdHEDTA ，其電荷密度應該比較小，但是 K 值竟然相差不大，在之前有提到原子序大的鑷系金屬錯合物其配位水較原子序大的配位水多，因此我們可以推測，由於配位水數量較多， BNPP 可以鍵結的位置較多，因此其鍵結常數也較大；接下來我們看到鍵結常數較低的 SmHEDTA 、 EuHEDTA 、 GdHEDTA ，我們發現這幾個錯合物正是水解效果較好的，先前我們推測原子序在 Gd 以前的錯合物至少具有三個配位水，所以說 K 值偏小，並不是因為配位水少的原因，也就是說這部份電荷密度大小影響鍵結為主要因素。綜合以上，我們可以知道金屬錯合物在水解 BNPP 時，兩者間需要有鍵結的產生，另外從原子序大的金屬錯合物我們可以得知，太強的鍵結反而會導致水解效果不好，在原子序小的金屬錯合物雖然其鍵結常數也不小，但是因為電荷密度小的關係，和 BNPP 的鍵結並不強，所以水解效果也不好，反觀配位水多但鍵結較弱的 SmHEDTA 、 EuHEDTA 、 GdHEDTA 反而有催化水解最好的條件；此外，在之前的實驗中雖然證明了 CeHEDTA 的反應機制不同，但是由 $[\text{LnHEDTA}]$ - dependent 的實驗中，我們也可以窺見 CeHEDTA 水溶液中的活性物種與 BNPP 的鍵結強度也是非常適合催化水解反應的。

第七章 LnHEDTA 水解 BNPP 之產物分析

*實驗目的

在先前的研究中，我們發現若取代基有氫氧基的存在，則反應有可能會進行轉酯反應而非水解反應，那產物不再是 NPP 而是 complex-NPP。另外，吳柏宏學長利用 UV 光譜學觀察到 EuHEDTA 在 pH11.0 下反應中的產物 NPP 也有進一步水解成 NP 的現象。因此，我們利用 HPLC 來證實反應為轉酯反應，產物為 complex-NPP 而非 NPP，同時利用積分面積來比較 HPLC 與 UV 光譜學所的數據上的差異性，而且觀察是否有進一步的水解反應產生。

*實驗準備與方法



A.使用藥品

分析樣品：[EuHEDTA]=10mM、[buffer]=100mM、 μ =0.1M、pH10.5 的溶液來進行產物分析。

HPLC 之動相：60% HPLC 級之甲醇／40% 50mM 的磷酸鹽緩衝溶液(NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4) pH 7.0

HPLC 之固相：C-18 管柱 (Symmetry[®] C18, 5 μ m, 4.6mm \times 250mm)

標準品：4-nitrophenolate(NP)、4-nitrophenyl phosphate(NPP)、BNPP

B.實驗儀器

HPLC 系統：Waters Alliance[®] 2695HPLC 系統

偵測器：Waters 2487 紫外光/可見光偵測器

層析軟體：Waters Empower 色譜管理系統

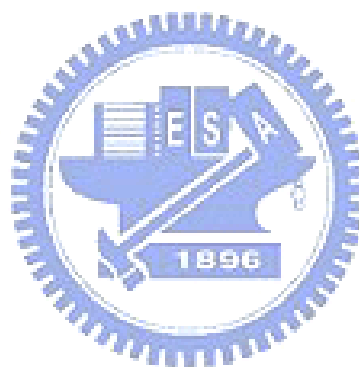
C.實驗條件

Flow rate : 0.5ml/min

Volume of per injection : $10\mu\text{l}$

Running time : 20 min

Detected Wavelength : 317nm



* 實驗結果

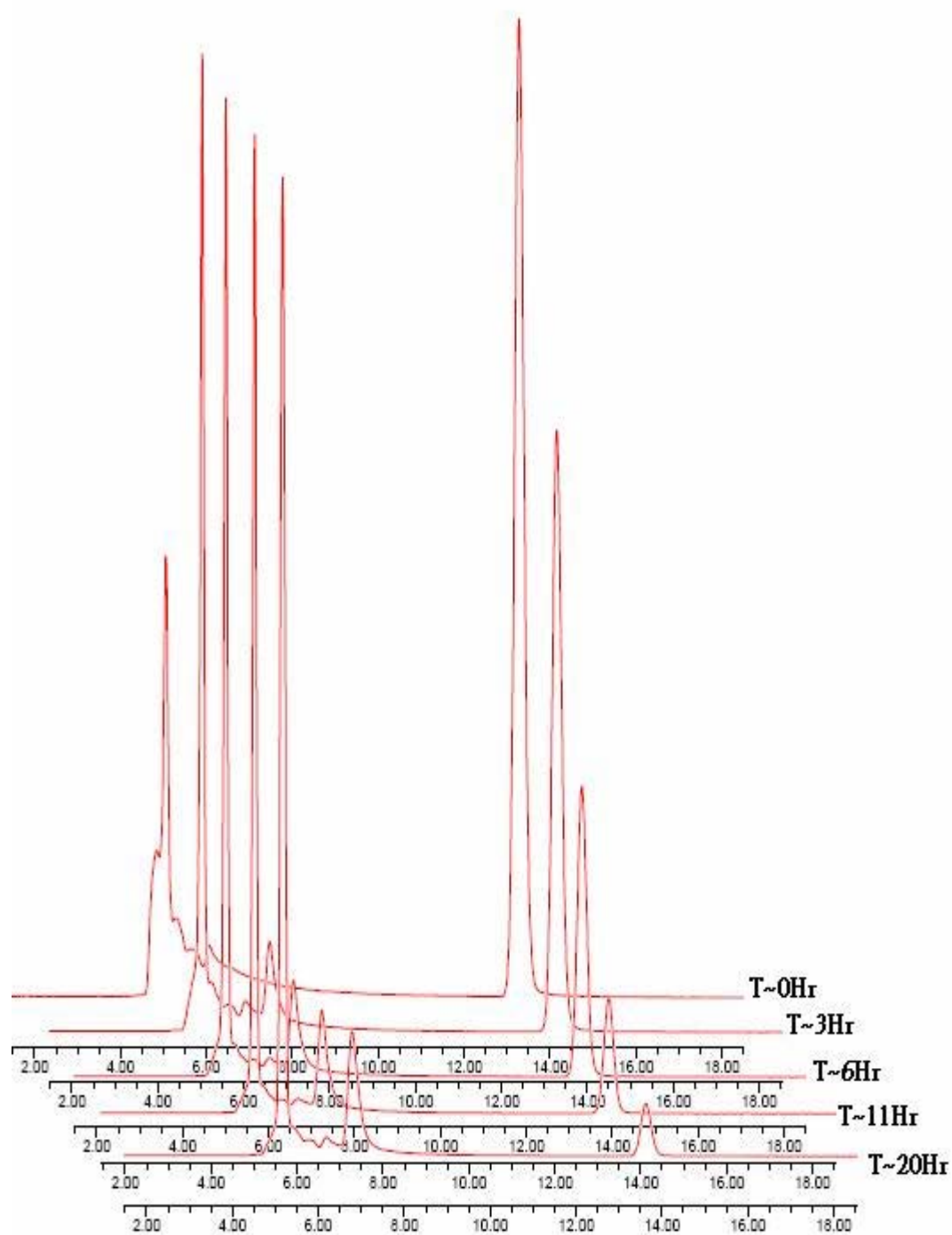


圖 7-1 EuHEDTA 水解 BNPP 之 HPLC 產物分析圖 peak1: RT 為 5.0min，屬於 NPP；Peak2：RT 為 6.6min，屬於 NP；Peak3：RT 為 13.3min，屬於 BNPP

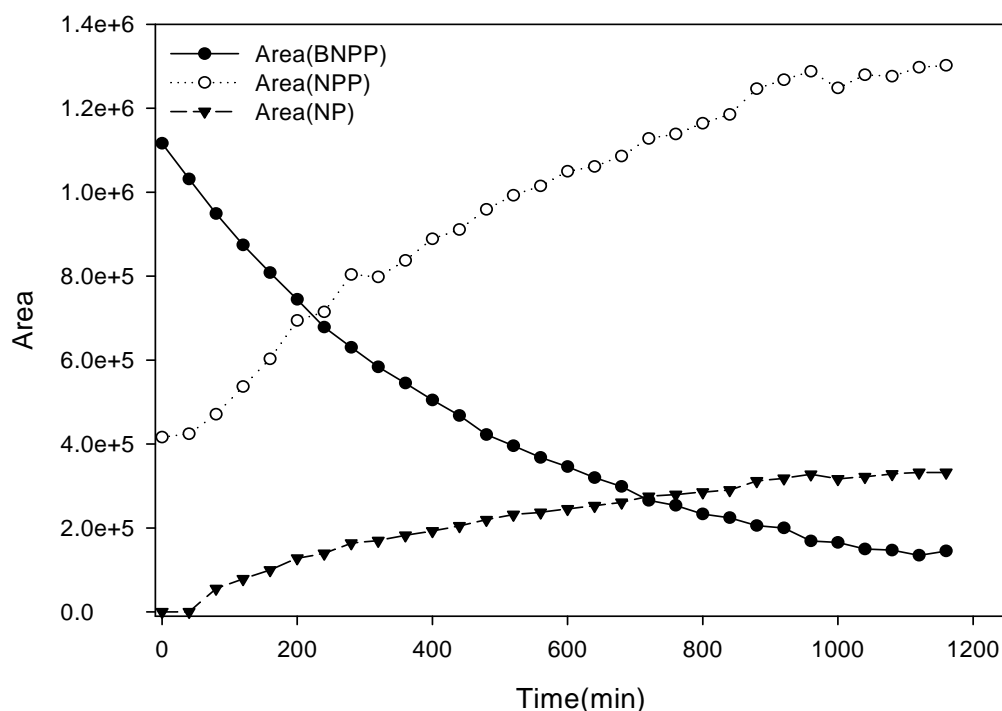


圖 7-2 HPLC 產物分析 各個波峰積分面積隨時間的變化圖

從圖 7-1 及 7-2 我們可以看到產物 NPP、NP 的波峰隨著時間持續的增加，受質 BNPP 隨著時間持續的在減少。同時我們利用波峰面積來定量，發現在這樣的時間及條件下 NPP 並不會進一步水解成 NP，由此得知 EuHEDTA 水解磷酸雙酯鍵的能力遠大於水解磷酸單酯鍵。

接著，我們將積分面積換算成濃度(圖 7-3)，並進一步計算出 BNPP、NPP、NP 濃度隨時間變化的速率，發現 NP 增加的濃度速率與 BNPP 消耗的速率相同，但在 NPP 的部份，理應等同於 NP 濃度，但我們意外發現 NPP 的濃度都比 NP 的濃度高。根據文獻，我們得知某些配位子上的氫氧基會與 BNPP 產生鍵結進行轉酯反應，造成反應完的產物為 NP 與 complex-NPP，我們推測反應中的 NPP 是接在我們的錯合物上面，造成其吸收度與單純的 NPP 有所差別，以至於計算出來的濃度與 NP 的濃度有差距，因此藉由 HPLC 的實驗我們得知 HEDTA 與 BNPP 的反應是進行轉酯反應，進一步我們可以利用 MS 來證實我們的這個推測。另外，我們觀察到一開始 NP 的濃度為零時，complex-NPP 的濃度卻並不為零，可見一

開始的時候，在 3 1 7 nm 有雜訊存在，導致在取面積時有誤差存在，因此在計算速率常數時，若將一開始的濃度校正後，再次計算速率常數會發現 complex-NPP 與 NP 增加的速率常數與 BNPP 消耗的速率常數大致上相符合，但因為我們無法精確的對 3 1 7 nm 的雜訊校正，導致 complex-NPP 增加的速率常數相對於 NP 增加的速率常數與 BNPP 消耗的速率常數誤差較大。

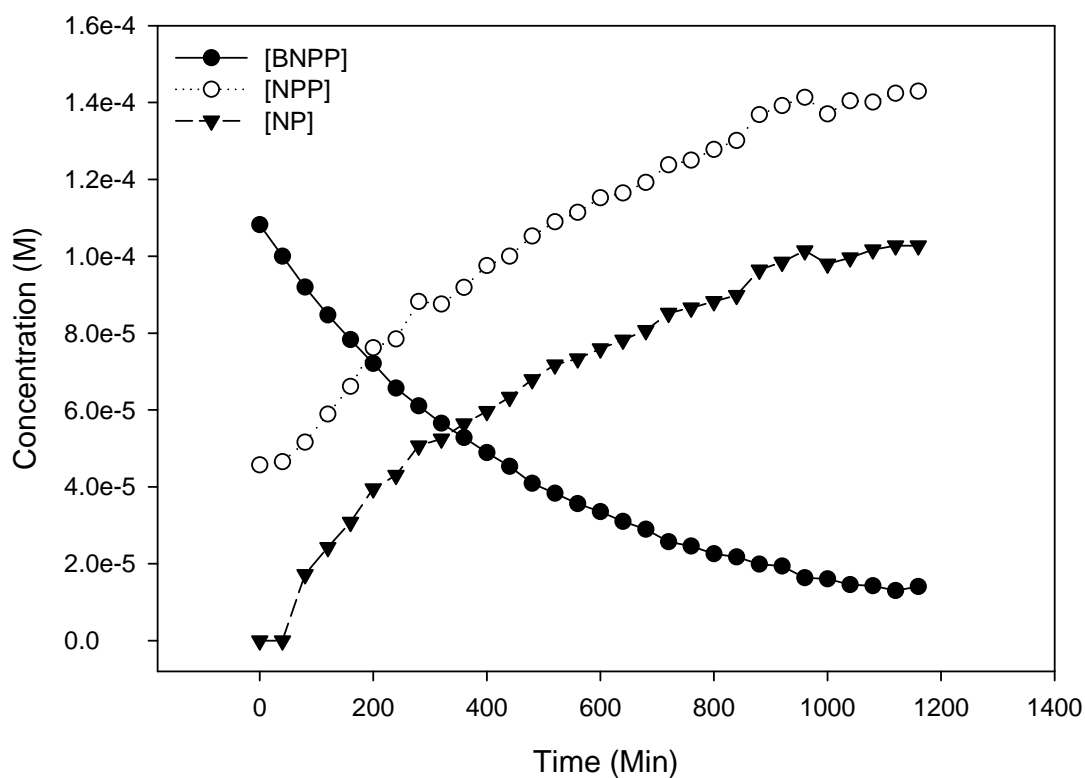


圖 7-3 BNPP、NP、NPP 積分面積換算成濃度對時間做圖

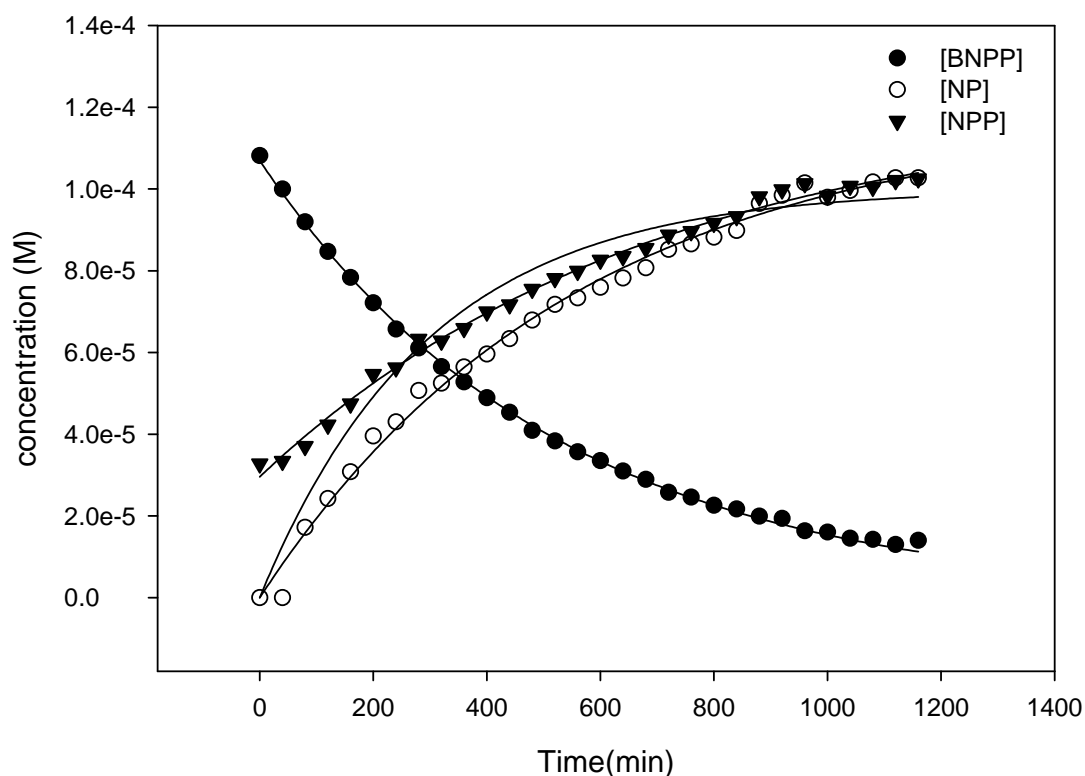


圖 7-4 反應中[BNPP]、[NPP]、[NP]隨時間的變化圖

		校正後
BNPP decay rate constant	1.94(±0.01)E-3	
NP growth rate constant	1.80(±0.08)E-3	
NPP growth rate constant	3.25(±0.20)E-3	1.44(±0.1)E-3

表 7-1 BNPP、NPP、NP 濃度隨時間變化的速率常數

我們也將 HPLC 實驗中 NP 的濃度變化數據計算出 initial rate，進一步的來跟之前利用 UV 光譜儀的方法來比較，發現使用的儀器不一樣，所求得的 initial rate 偏低(見圖 7-4)，根據 initial rate 的定義是要取反應的前 5% 數據來計算，但是 HPLC 的數據點數太少無法取的合適的數據來計算，因此取得的數據為反應的前 10% 來計算，儘管如此，雖然偏低但還是在誤差範圍內，因此水解 BNPP 的動力學實驗，同樣可以利用 HPLC 來進行，而且利用 HPLC 我們同時可以看見反應中物種的變化情況，可以更進一步的來推測整個反應機制，了解反應是如何進行的。

雖然，我們在此實驗條件下並沒有辦法將 NPP 與 complex-NPP 的滯留時間分離開來，但吸收度的差異我們間接證實了產物為 complex-NPP，未來我們可以將 C18 管柱替換成離子交換層析管柱，因為 complex-NPP 與 NPP 所帶的電荷同為負一價，但是 complex-NPP 的分子量遠大於 NPP 的分子量，離子性的差異性會更顯著，推測利用離子性交換析管柱來分離可以得到更直接的證據來證實我們的推論。

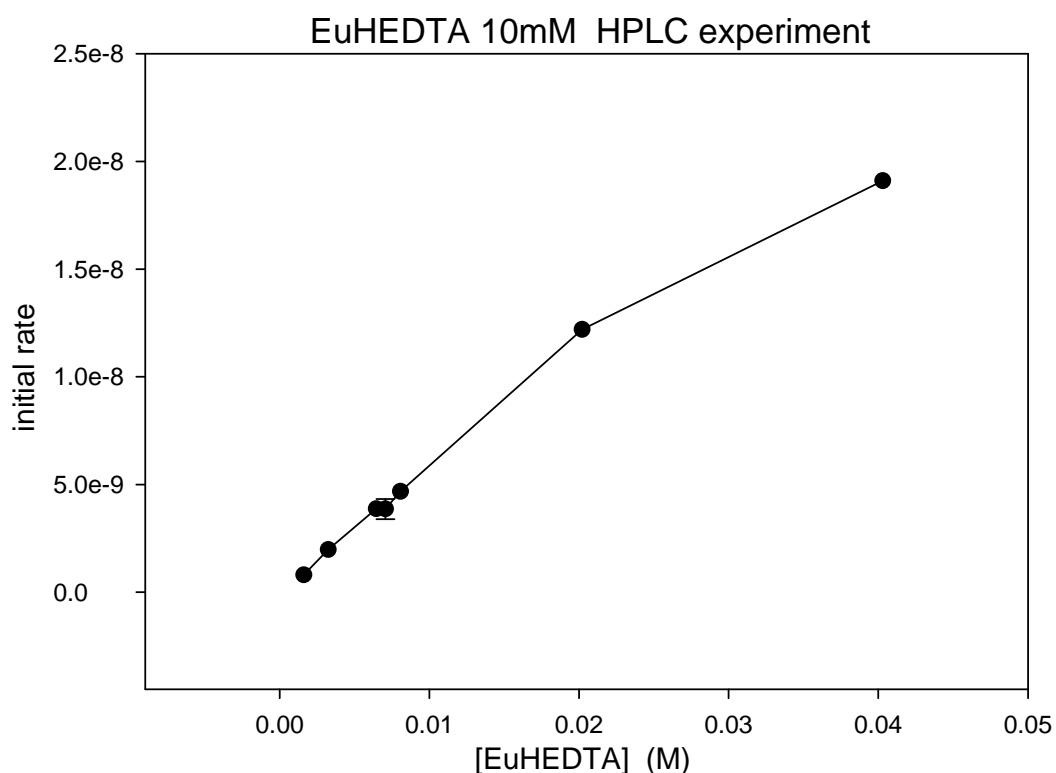


圖 7- 4 [EuHEDTA]=10mM HPLC 之 NP 增加 initial rate 計算結果與 UV 光譜實驗結果對照圖

第八章 結論與未來展望

1. 設計人造水解酶的重點在於使用的金屬離子，金屬離子扮演路易士酸的角色，強度越強，切割的效果越快，因此我們選擇鑷系金屬做為嵌合的金屬。但是因為鑷系金屬活性大，合適的配位子就很重要了。我們合成了 DO2PA 做為配位子，發現其錯合效果非常差，因此我們可以知道，對於四氮十二元環來說，碳鏈越長會導致大環更勁固(rigid)，為了包覆鑷系金屬反而導致環穴變小，與鑷系金屬錯合的能力並沒有因此而得到改善，反而是大大的降低。
2. 在 HEDTA 做為配位子的條件下，我們進一步了解到鑷系金屬中，Ce 的反應機制與其他的鑷系金屬不同，其水解 BNPP 的反應中，BNPP 的級數為 0.15 非常接近零，但是水解速率為 $2.12(\pm 0.35) \times 10^{-2}$ 是最快的。關於 Ce 的研究，可能全程實驗都要在氮氣狀況下，才能去除 Ce^{3+} 氧化成 Ce^{4+} 的因素，真正的就 CeHEDTA 來探討。
3. 我們意外的發現 HoHEDTA、TbHEDTA 水解 BNPP 是呈現二次式的趨勢曲線，推測其錯合物的結構、配位水的位向以及金屬的特性可能有助於雙體的形成，就我們知道大環金屬錯合物容易形成多核的聚合體，我們也許可以利用結構較簡單的 HoHEDTA 及 TbHEDTA，來進一步研究聚合體形成時，相關結構上的特性。
4. 在 pK_h 的部份，單純鑷系金屬之 pK_h 隨著原子序的增加，由 9.14 降低至 7.98；利用 UV 光譜學所計算出來 LnHEDTA 之 pK_h 隨著原子序的增加，由 10.06 降低至 8.51。我們明顯的觀察到鑷系金屬在與 HEDTA 錯合後，發現隨著原子序的增加，LnHEDTA 之 pK_h 和 Ln^{3+} 的 pK_h 的差值由 1.17 降低至 0.53，可以知道形成錯合物後，配位子 HEDTA 對於電荷密度影響會隨著原子序的

增加而減少。

5. 在 $k_{LnL(OH)}$ 的結果部份，除了 CeHEDTA 以外，從 PrHEDTA 至 GdHEDTA 開始， $k_{LnL(OH)}$ 由 $1.14(\pm 0.07)E-5$ 增加至 $3.35(\pm 0.53)E-3$ ，從 GdHEDTA 至 LuHEDTA 開始，則由 $3.35(\pm 0.53)E-3$ 降低至 $5.21(\pm 0.13)E-4$ ，鑷系金屬錯合後理應會帶有三個配位水，原子序越大，電荷密度越大，水解速率越快，從實驗結果來看，在 GdHEDTA 之後水解速率就降低了，可能就是因為立體結構的差異導致配位水的數目減少了，這部分我們可以進一步利用雷射光譜學的方式來計算配位水的數目，證實我們的推測。
6. 在 $K((LnHEDTA(OH))-BNPP \text{ binding constant})$ 的部份，原子序大 LuHEDTA 的其 K 值為 $7.48(\pm 2.47)E+4(M^{-1})$ ，原子序在中間的 EuHEDTA 其 K 值為 $1.61(\pm 0.46)E+3(M^{-1})$ ，原子序小的 PrHEDTA 其 K 值為 $6.92(\pm 2.97)E+4(M^{-1})$ 。其中反而是鍵結較弱的 EuHEDTA，其水解效率最好。因此我們可以了解到金屬錯合物與 BNPP 的鍵結強度，太強或太弱都不好，就像酵素和受質的關係，如果兩者間鍵結太強，受質就卡在酵素裡不利於催化反應的進行。
7. 在鑷系金屬中，就以原子序為 62 的 Sm、63 的 Eu、64 的 Gd 之金屬錯合物最適合做水解反應，這和實驗室之前選用 La、Eu、Yb 之鑷系金屬大環錯合物來做相關動力學實驗，發現 Eu 之大環錯合物水解效果也是最佳的結果相符合。因此，雖然線性分子 HEDTA 與大環金屬錯合物在結構上有所差別，但是經由這樣一連串的實驗我們還是可以知道位於鑷系金屬中間的 Sm、Eu、Gd 的錯合物，不論是配位水的數目、配位水的位向、錯合物的電荷密度與受質 BNPP 鍵結的強度等條件，都是最適合水解反應進行的。
8. 在結構的研究上，則希望可以將鑷系金屬錯合物結晶出來，以證實我們的推論。進一步從結構上來探討影響水解反應的因素，以期能建立未來設計更好

的人造水解酶的基礎。

9. 我們利用 HPLC 來進行動力學的實驗，發現也可以得到與利用 UV 光譜實驗所得到的數據有類似的結果，但是利用 HPLC 我們可以更進一步的看見物種的變化，因此在未來進行水解的相關實驗時，也可以用 HPLC 來進行，不僅可以得到的動力學的相關數據，更可以推測出反應機制。
10. 利用 HPLC，我們觀察到實驗中 NPP 的吸收度與我們的標準品 NPP 之吸收度不同，間接證明 EuHEDTA 所進行的反應為轉酯反應，證實了配位子如果有有氫氧基的取代基，則會進行轉酯反應而非水解反應。未來在設計配位子時，若是需要研究轉酯反應的機制，就可以朝取代基為氫氧基著手來進行。
11. 長時間觀測 EuHEDTA 在 pH10.5 下水解 BNPP 的實驗中，我們觀察不到 NPP 進一步水解成 NP 的現象，但在吳柏宏學長先前進行 pH11.0 下進行 EuHEDTA 水解 BNPP 的實驗中有觀察到 NPP 進一步水解成 NP 的現象，未來我們可以進行 LnHEDTA 在更高 pH 值下的相關實驗，同時利用 HPLC 來監測溶液中物種的變化，了解在高 pH 值下 LnHEDTA 的反應機制。

參考文獻

1. Hegg, E. L.; Burstyn, J. N., *Coordination Chemistry Reviews* 1998, 173, 133-165.
2. Bashkin, J. K.; Frolova, E. I.; Sampath U., *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 5981-5982
3. Oivanen, M.; Kuusela, S.; Lönnberg, H., *Chemical Reviews* 1998, 98, 961-990.
4. David Lipkin, Preston T. Talbert, Mildred Cohn *J. Am. Chem. Soc.*; 1954; 76 ; 2871-2872.
5. Komiyama, M.; Takeda, N.; Shigekawa, H., *Chemical Communications* 1999, 1443-1451.
6. Kuimelis, R. G.; McLaughlin, L. W., *Chemical Reviews* 1998, 98, 1027-1044.
7. Nikolic-Hughes, I.; O'Brien, P. J.; Herschlag, D., *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127, 9314-9315.
8. Trawick, B. N.; Daniher, A. T.; Bashkin, J. K., *Chemical Reviews* 1998, 98, 939-960.
9. Istvan Kolossvary, Wayne C. Guida *J. Am. Chem. Soc.*; 1993; 115, 2107-2119
10. Makoto Komiyama, Naoya Takeda and Hidemi Shigekawa, *Chem. Commun.*, 1999, 1443
11. Endo, M.; Azuma, Y.; Saga, Y.; Kuzuya, A.; Kawai, G.; Komiyama, M. *J. Org. Chem.*; (Article); 1997; 62, 846-852
12. Maldonado, A. L.; Yatsimirsky, A. K., *Organic & Biomolecular Chemistry* 2005, 3, 2859-2867.
13. Jebasingh, B.; Alexander, V., *Inorganic Chemistry* 2005, 44, 9434-9443.
14. Gellman, S. H.; Petter, R.; Breslow, R., *Journal of the American Chemical Society* 1986, 108, 2388-2394.

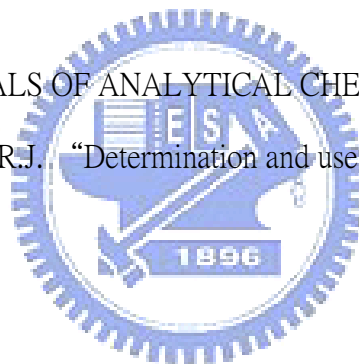
15. Hendry, P.; Sargeson, A. M., *Journal of the American Chemical Society* 1989, 111, 2521-2527.
16. Krämer, R., *Coordination Chemistry Reviews* 1999, 182, 243-261.
17. Kövári, E.; Krämer, R., *Journal of the American Chemical Society* 1996, 118, 12704-12709.
18. Burstyn, J. N.; Deal, K. A., *Inorganic Chemistry* 1993, 32, 3585-3586.
19. Deal, K. A.; Burstyn, J. N., *Inorganic Chemistry* 1996, 35, 2792-2798.
20. Hegg, E. L.; Mortimore, S. H.; Cheung, C. L.; Huyett, J. E.; Powell, D. R.; Burstyn, J. N., *Inorganic Chemistry* 1999, 38, 2961-2968.
21. Deck, K. M.; Tseng, T. A.; Burstyn, J. N., *Inorganic Chemistry* 2002, 41, 669-677.
22. Morrow, J. R.; Buttrey, L. A.; Shelton, V. M.; Berback, K. A., *Journal of the American Chemical Society* 1992, 114, 1903-1905.
23. Amin, S.; Voss, D. A.; Horrocks, W. D.; Morrow, J. R., *Inorganic Chemistry* 1996, 35, 7466-7467.
24. Chappell, L. L.; Voss, D. A., Jr.; Horrocks, W. DeW., Jr.; Morrow, J. R. *Inorg. Chem.*, 1998; 37, 3989-3998
25. McCue, K. P.; Morrow, J. R., *Inorganic Chemistry* 1999, 38, 6136-6142.
26. Iranzo, O.; Elmer, T.; Richard, J. P.; Morrow, J. R., *Inorganic Chemistry* 2003, 42, 7737-7746.
27. Iranzo, O.; Richard, J. P.; Morrow, J. R. *Inorg. Chem.*; (Article); 2004; 43, 1743-1750

28. O'Donoghue, A.; Pyun, S. Y.; Yang, M.-Y.; Morrow, J. R.; Richard, J. P. *J. Am. Chem. Soc.*; (Article); 2006; 128, 1615-1621
29. Gomez-Tagle, P.; Yatsimirsky, A. K. *Inorg. Chem.*; (Article); 2001; 40, 3786-3796
30. Gomez-Tagle, P.; Yatsimirsky, A. K., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1998, 2957-4502
31. Maldonado, A. L.; Yatsimirsky, A. K., *Org. Biomol. Chem.* 2005, 3, 2859-2867
32. 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.
33. 吳柏宏, 鑷系金屬離子錯合物水解磷酸酯鍵之動力學研究, 國立交通大學生物科技所, 2003, 碩士論文
34. Chang, C. A.; Wu, B. H.; Kuan, B. Y. *Inorg. Chem.*; (Article); 2005; 44, 6646-6654
35. 林玉淳, 大環配位子結構與質子化系統及鑷系金屬離子錯合物結構之分子模擬, 國立交通大學生物科技所, 2006, 碩士論文
36. 蔡政憲, 鑷系金屬錯合物之熱力學與水解磷酸酯鍵之動力學研究, 國立交通大學生物科技所, 2006, 碩士論文
37. Cabral, M. F.; Costa, J.; Delgado, R.; Dasilva, J.; Vilhena, M. F., *Polyhedron* 1990, 9, 2847-2857
38. Hancock, R. D.; Thöm, V. J., *Journal of the American Chemical Society* 1982, 104, 291-292
39. Rossiter, C. S.; Mathews, R. A.; Morrow, J. R., *Inorganic Chemistry* 2005, 44, 9397-9404.
40. GROS C. ; CHOLLET H. ; MISHRA A. K. ; GUILARD R., *Synth. Commun.* ,

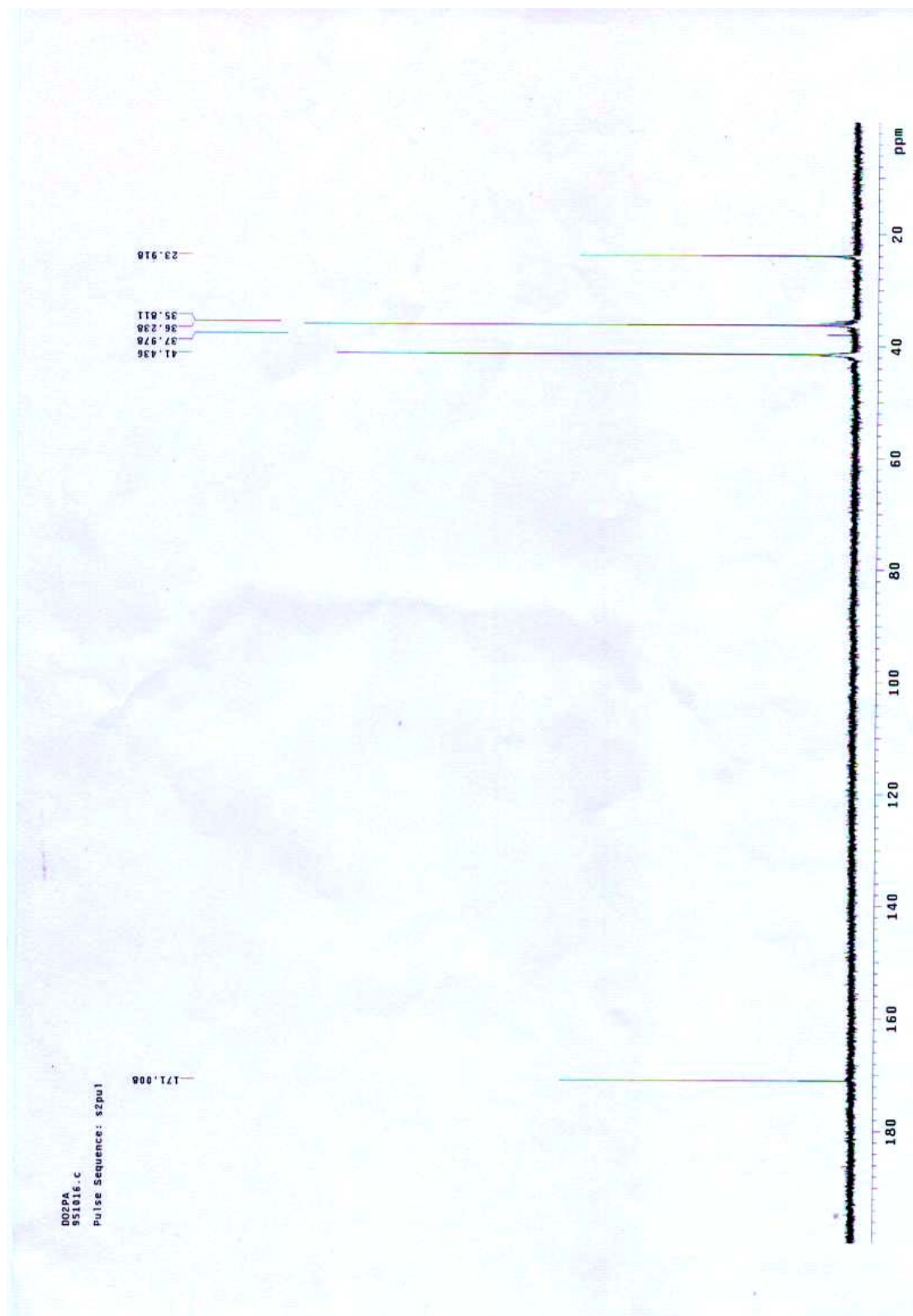
1996, 26, 35-47

41. Jack E. Richman, Thomas J. Atkins *J. Am. Chem. Soc.*; 1974; 96 , 2268-2270
42. Atkins, T.J.; Richman, J.E. ; Oettle, W.F. *Org. Synth.* 1978, 58, 86-97
43. Lazar, I. *Synth. Commun.* ,1995, 25 ,3181-3185
44. Takashi Yatsunami, Atsuko Sakonaka, Eiichi Kimura *Anal. Chem.*; 1981; 53, 477-480
45. Jacques Fastrez *Tetrahedron. Lett.*, 1987,28, 419-422
46. Bradshaw, J. S.; Krakowiak, K. E.; Izatt, R. M., "Aza-crown Macrocycles," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1993
47. Roigk, A.; Yescheulova, O. V.; Fedorov, Y. V.; Fedorova, O. A.; Gromov, S. P.; Schneider, H.-J. *Org. Lett.*;1999; 1 ; 833-835.
48. Kovacs, Z.; Sherry, A.D. *Synthesis*,1997,759-763
49. Chang, C. A.; Chen, Y. H.; Chen, H. Y.; Shieh, F. K., *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* 1998, 3243-3248.
50. Huskens, J.; Torres, D. A.; Kovacs, Z.; Andre, J. P.; Geraldès, C. F. G. C.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.*; 1997; 36, 1495-1503.
51. 王翊帆, 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, 國立交通大學生化工程所, 2007, 碩士論文
52. Krishan Kumar, M. F. Tweedle, M. F. Malley, J. Z. Gougoutas *Inorg. Chem.*; 1995; 34, 6472-6480
53. Krishan Kumar; C. Allen Chang.; L. C. Francesconi ; D. D. Dischino; M. F. Malley ;J. Z. Gougoutas ;M. F. Tweedle *Inorg. Chem.* 1994, 33, 3567-3575
54. Janet R. Morrow, Shahid Amin, Charles H. Lake, Melvyn Rowen Churchill *Inorg. Chem.*; 1993; 32, 4566-4572.
55. Smith, R. M.; Martell, A. E., *Critical Stability Constants*. 1974-1989.
56. Therald Moeller, Dean F. Martin, Larry C. Thompson, Ricardo Ferrús, Gerald R.

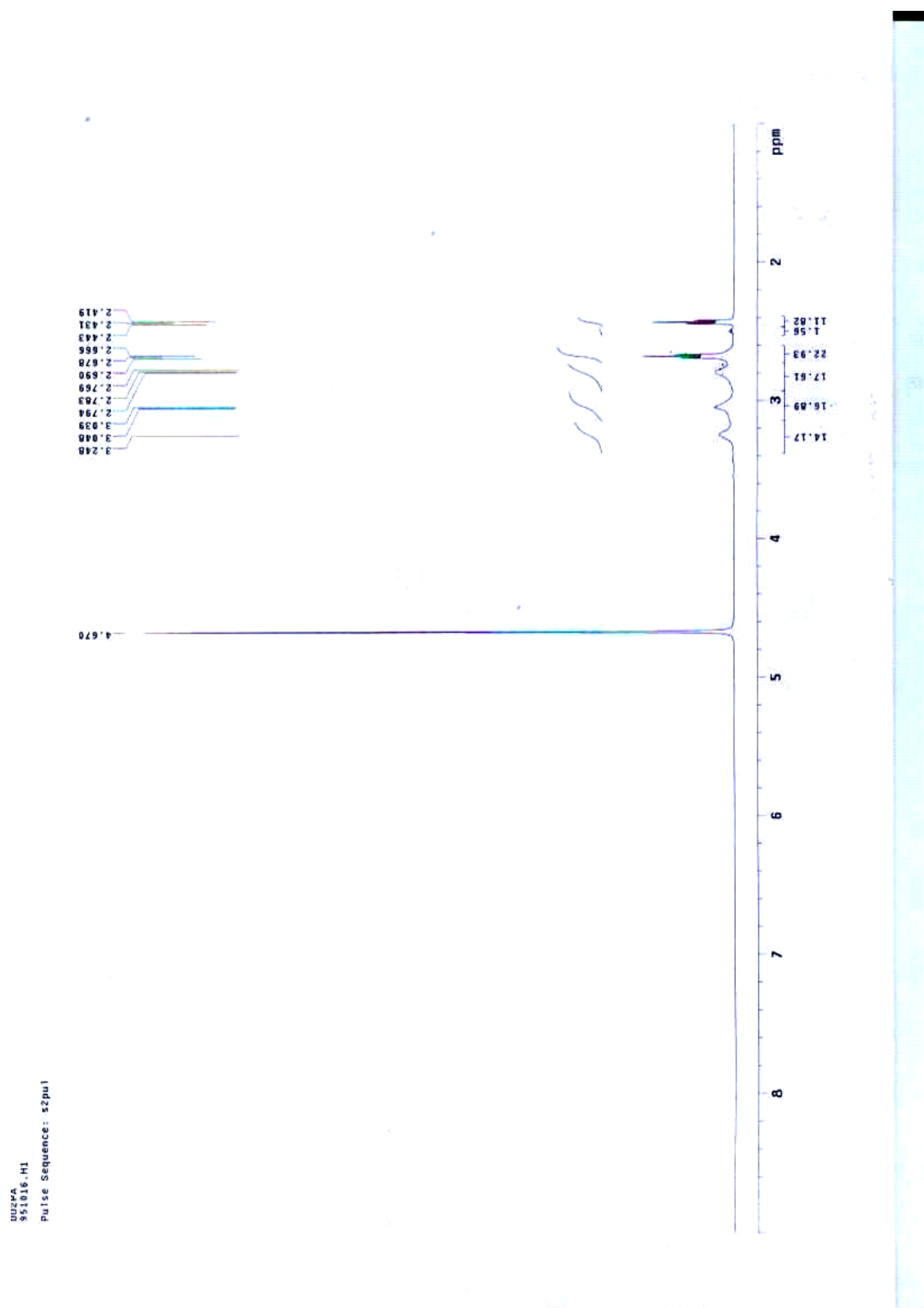
- Feistel, William J. Randall *Chem. Rev.*; 1965; 65; 1-50.
57. Bryan K. Takasaki, Jik Chin *J. Am. Chem. Soc.*; 1994; 116; 1121-1122.
58. Makoto Komiyama, Tetsuro Shiiba, Teruyuki Kodama, Naoya Takeda, Jun Sumaoka and Morio Yashiro, *Chem. Lett.* 1994, 1025-1028
59. Makoto Komiyama, Naoya Takeda, Yota Takahashi, Hiroshi Uchida, Tetsuro Shiiba, Teruyuki Kodama and Morio Yashiro, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1995, 269-274
60. Moeller, T., and Ferris, R., *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1961, 20, 261
61. Powell, J. E., and Mackey, J. L., *Inorg. Chem.* 1962, 1, 418
62. Spedding, F. H., Powell, J. E., and Wheelwright, E. J., *J. Am. Chem. Soc.* 1956, 78, 834
63. Baker, B. F.; Khalili, H.; Wei, N.; Morrow, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 38, 8749-8755
64. SKOOG: FUNDAMENTALS OF ANALYTICAL CHEMISTRY 7/E
65. Matell, A. E.; Motekaitis, R. J. "Determination and use of Stability constant", 2nd ed., 1992



附錄一 DO2PA ^{13}C NMR

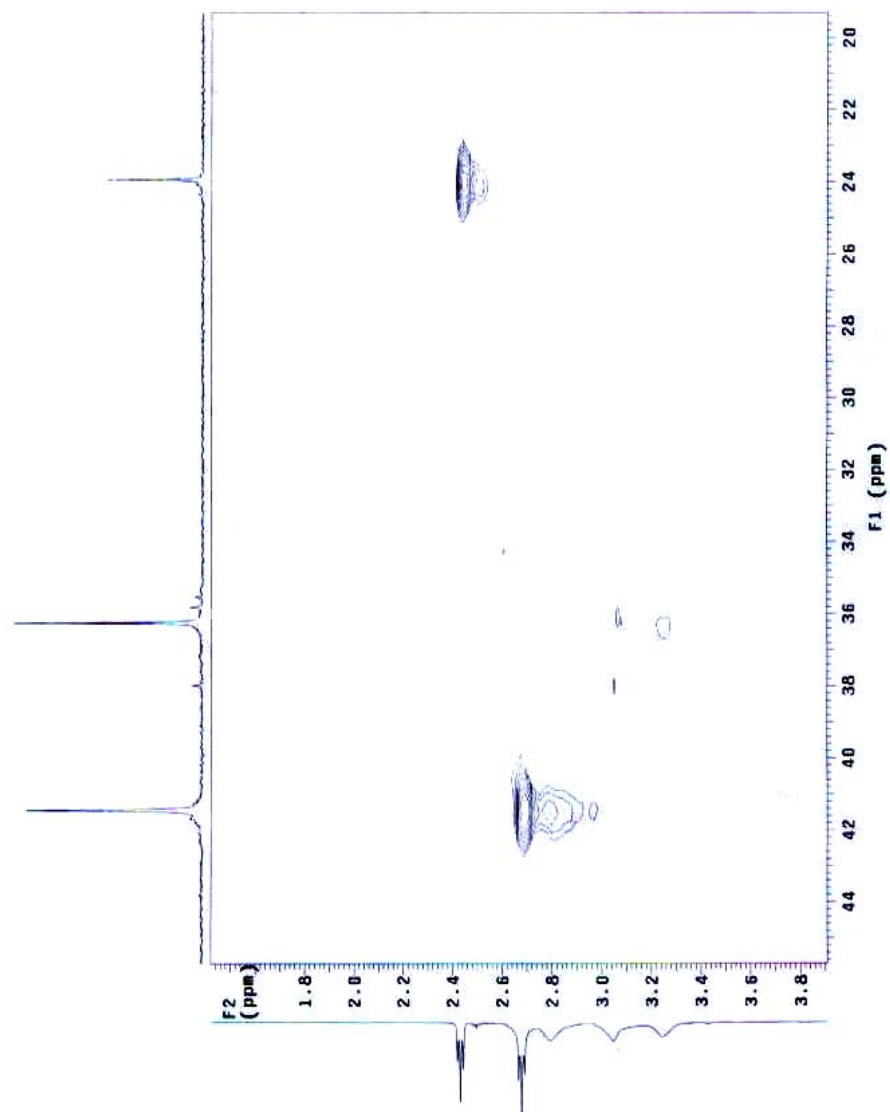


附錄二 DO2PA ^1H NMR

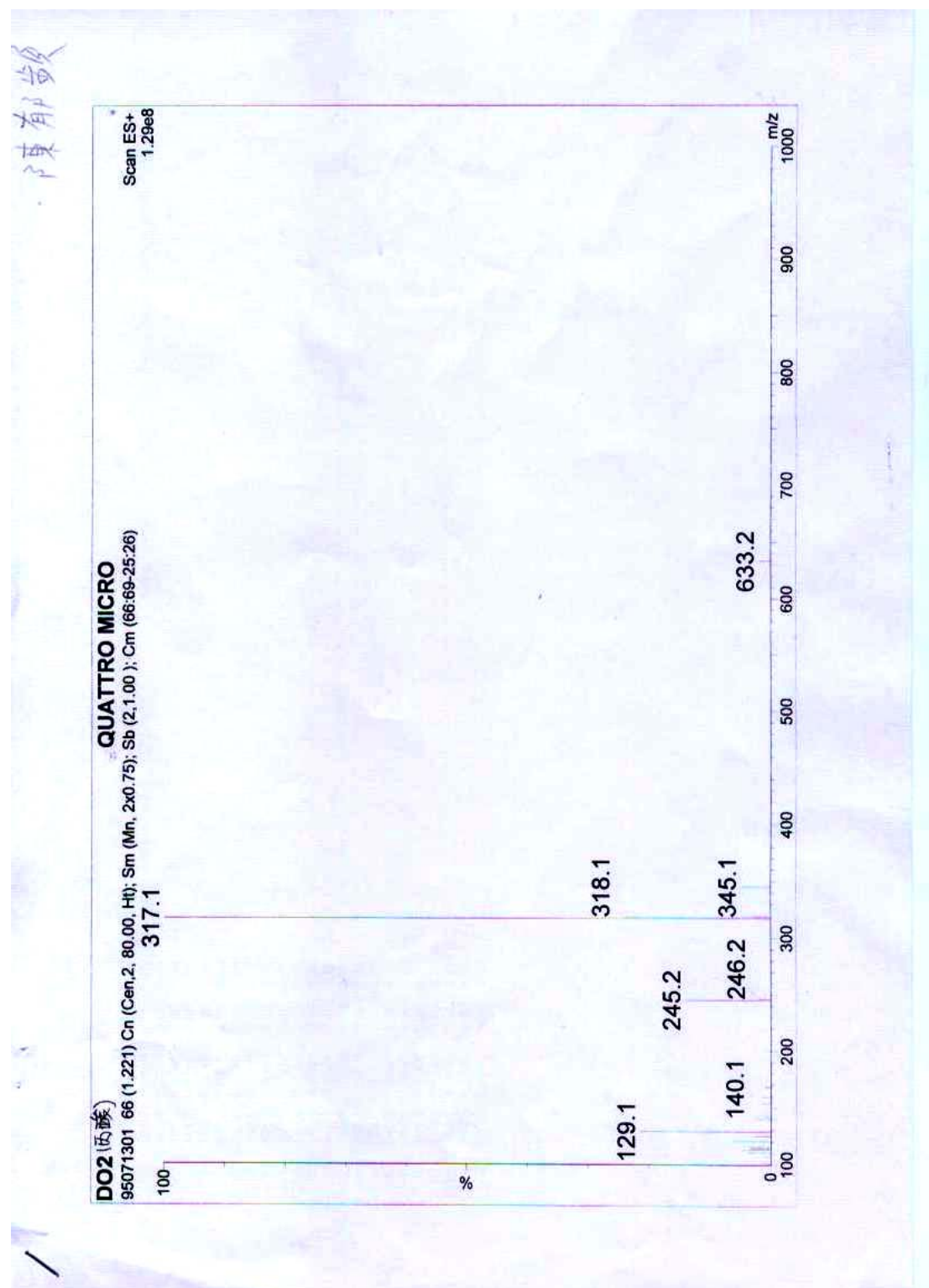


附錄三 DO2PA 2D NMR

DO2PA
951016-gmhc
Pulse Sequence: gmhc



附錄四 DO2PA MASS (ESI⁺)



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：陳郁頻		中心編號：951004	
服務單位：交大生科 張正實驗室		樣品名稱或代號：DO2PA	
收件日期：95 年 10 月 11 日		完成日期：95 年 10 月 17 日	
分析結果：			
實驗值：	N%	C%	H%
1.	12.49	37.01	7.72
2.	12.46	36.74	7.72
3.			
推測值：	17.71	53.15	8.92
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：	10.45	71.39	6.67
備註：			
費用核算：NCH：800 元			
報告日期：95 年 10 月 19 日			

儀器負責人簽章：謝有容

技術員簽章：

技士李慈明