

中華民國第 61 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 化學科

佳作

050201

探討 MPT-Cy2 作為活性氧類(ROS)指示劑之利用

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 林晨筠 高二 黃俐晴	指導老師： 吳榮修
-------------------------	--------------

關鍵詞：自由基、芬頓反應、

電子順磁共振光譜儀(EPR)

摘要

MPT-Cy2 是一種容易與自由基發生反應的化合物，並產生如顏色及吸收光譜改變等變化。故本研究嘗試利用此特性，探討將 MPT-Cy2 作為活性氧類(ROS)指示劑的可能性。

實驗第一部份成功由硫化二苯胺合成出 MPT-Cy2，並由電噴灑游離質譜儀(ESI-MS)與 X 光單晶繞射儀(X-ray)證實其結構無誤。

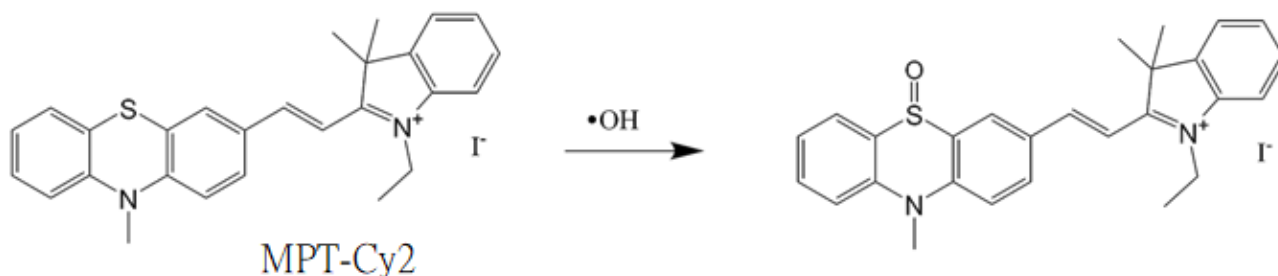
第二部份的實驗首先利用過氧化氫與亞鐵離子進行芬頓反應(Fenton Reaction)，作為氫氧自由基的來源，再探討 MPT-Cy2 與氫氧自由基反應之特性。實驗結果顯示，在電子順磁共振光譜儀(EPR)與紫外光可見光光譜儀(UV-Vis)的光譜圖上，皆可證實 MPT-Cy2 確能與氫氧自由基產生結合反應。其中 MPT-Cy2 與過氧化氫之莫耳數比例為 1:10000 時反應速率最快，且結合反應能持續至 830 分鐘，未來可望作為活性氧類(ROS)指示劑。

壹、研究動機

自由基的探討及應用普遍地存在於各類的科學研究及日常生活當中，舉例而言，部分藥物、環境污染物以及人眼，在光照過量的狀況下皆會產生大量的自由基，以至於對環境及人體造成影響，而在醫學部分的應用，「可於細胞中以 ROS(活性氧類)的形式引發癌症」的議題更是提高了在「自由基檢測」這方面的關注度。

而在自由基檢測方面，目前電子順磁共振光譜儀(EPR)，是已知檢測儀器中唯一一台可定量檢測自由基之精密儀器。但在多數自由基存活周期過短的特性下，EPR 在檢測此類自由基時需加入如 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide(DMPO)這樣的自由基捕捉劑，以延長自由基的存在時長。然而 DMPO 僅適用於 EPR 的使用上，無法為其他光譜儀所用，因此，我們希望能找出對於特定自由基具有專一性的捕捉劑，並在查找文獻後，發現 MPT-Cy2 可與氫氧自由基反應，產生螢光，如圖(一)，並決定以此做為研究方向。

經過資料查詢，我們發現不少關於自由基的形成、分析以及檢測的研究，並同時決定往自由基檢測的方面進行發展，而在文獻(Liu et al., 2016)¹中曾提到一種以螢光檢測自由基的方法，本研究嘗試以此為基礎，合成出 MPT-Cy2，並探討其在檢測自由基的效用，期望能以其發光的程度來判定自由基，與 EPR 產生類似效果，以便於未來將其應用於自由基檢測相關方面之應用，或者對此類染料試劑進一步修飾以促進其對自由基之反應。



圖(一)

貳、研究目的

- 一、由硫化二苯胺合成 MPT-Cy2，並利用 X 光單晶繞射儀(X-ray)、電噴灑游離質譜儀(ESI-MS)來檢驗其結構。
- 二、利用紫外光可見光光譜儀(UV-Vis)、電子順磁共振光譜儀(EPR)分析 MPT-Cy2 與氫氧自由基反應之特性並繪製關係圖。

參、研究設備及器材

一、設備

(一)實驗設備及儀器

- 1.電子順磁共振光譜儀(EPR)
- 2.核磁共振儀(NMR)
- 3.紫外光可見光光譜儀(UV-Vis)
- 4.X 光單晶繞射儀(X-ray)
- 5.電噴灑游離質譜儀(ESI-MS)
- 6.旋轉減壓濃縮機
- 7.磁石攪拌器
- 8.油浴迴流裝置
- 9.TLC 片
- 10.電子天平
- 11.微量吸管(pipetman)
- 12.布氏漏斗

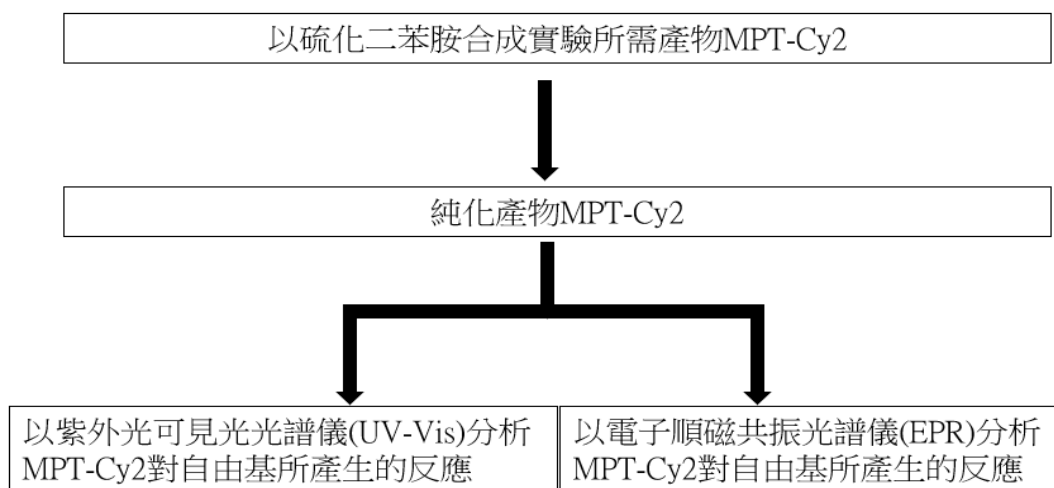
(二)藥品

1. 硫化二苯胺(phenothiazine)

2. 氫化鈉(NaH)
3. 二甲基甲醯胺(Dimethylformamide,DMF)
4. 碘甲烷(Methyl iodide,CH₃I)
5. CH₃CH₂I(iodoethane)
6. 三氯氧磷(Phosphoryl chloride,POCl₃)
7. 2,3,3-trimethyl-indole
8. 乙腈(acetonitrile,ACN)
9. 乙醇(ethanol,EtOH)
10. 哌啶(piperidine)
11. 甲苯(toluene,PhMe)
12. 二氯甲烷(Dichloromethane,DCM)
13. 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide(DMPO)
14. 三氯甲烷(Trichloromethane)
15. 四苯硼鈉(Sodium tetraphenylborate)
16. 正己烷(Hexane)
17. 氯化亞鐵(dichloroiron;tetrahydrate,Cl₂Fe • 4H₂O)
18. 過氧化氫 35%、28%(hydrogen peroxide,H₂O₂)
19. 無水硫酸鎂(Magnesium sulfate,MgSO₄)

肆、研究過程或方法

一、研究流程圖



圖(二)研究流程圖

二、EPR 檢測氫氧自由基

本實驗旨在使用 EPR 檢測過氧化氫的自由基，證實 EPR 可用於檢測自由基，在本研究產物分析的部分將以 EPR 作為檢測儀器，用於分析產物 MPT-Cy2，實驗的設計及過程如下：

(一)實驗設計:

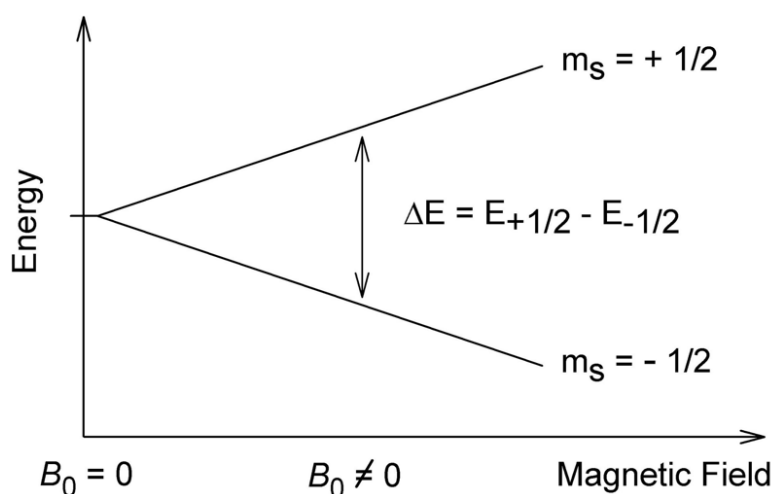
為測驗雙氧水在照可見光以及紫外光的情況下，能否穩定產生自由基。此部分將分為四組進行試驗，共有兩種變因，分別為加水或雙氧水以及照可見光或紫外光。配製藥品，取混合好的溶液以毛細管抽取，每組照光 900 秒，並在 0 秒、30 秒、60 秒、300 秒、900 秒時分別作圖記錄。

而採用毛細管的原因，是由於先前的實驗中，發現容器內殘留的髒污可能影響實驗，故採用毛細管進行實驗，以降低干擾。

(二)實驗原理:

EPR 全名為電子順磁共振光譜儀，EPR 的原理主要遵循賽曼效應(Zeeman Effect)，也就是未成對電子的能量分裂原理。由於每個電子對的兩電子必為一個自旋向上 ($m_s=+1/2$)，一個自旋向下 ($m_s=-1/2$)，在沒有外加磁場的條件下，兩個自旋相反的電子能量相同，而一但加入外加磁場，造成軌域分裂，兩電子便會產生能量差。

因此，當未成對電子存在時，未成對電子的能量範圍將在此兩條斜線之間躍動，如圖(三)。此時再打入微波，當分裂軌域的能階差恰等於微波的能量時，電子會吸收微波的能量而被激發，EPR 則會測量傳回的微波，並得出初步數據。而將初步數據進行一次微分，便可得到 EPR 光譜；若將光譜數據進行二次積分，便可得到其積分面積。

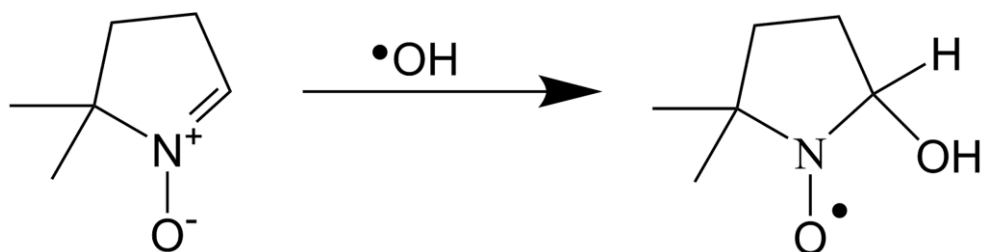


Zeeman Effect

圖(三)

當圖形產生具有一定特徵之劇烈波形時，表示樣品中含有自由基，且自由基之種類可透過波形判斷；積分面積則正比於樣品所含自由基之濃度，故可利用積分面積比較不同樣品中所含自由基濃度。本研究主要以此作為分析依據。

已知過氧化氫在吸收一定的能量後，氧與氧間會斷鍵，導致氫氧自由基的產生，由於氫氧自由基的生命週期僅有幾秒的時間，不利於儀器檢測，故為延長其生命週期，需在樣品中加入 DMPO 作為氫氧自由基捕捉劑。



圖(四)DMPO 與氫氧自由基之反應過程

(三)實驗步驟:

1.配製藥品

(1)雙氧水溶液:35%雙氧水 40 mg + 20 mL 水

(2)DMPO 溶液:DMPO 10 μ L + 5 mL 水

2.分組進行實驗

(A 組)雙氧水 250 μ L + DMPO 溶液 750 μ L 照紫外光

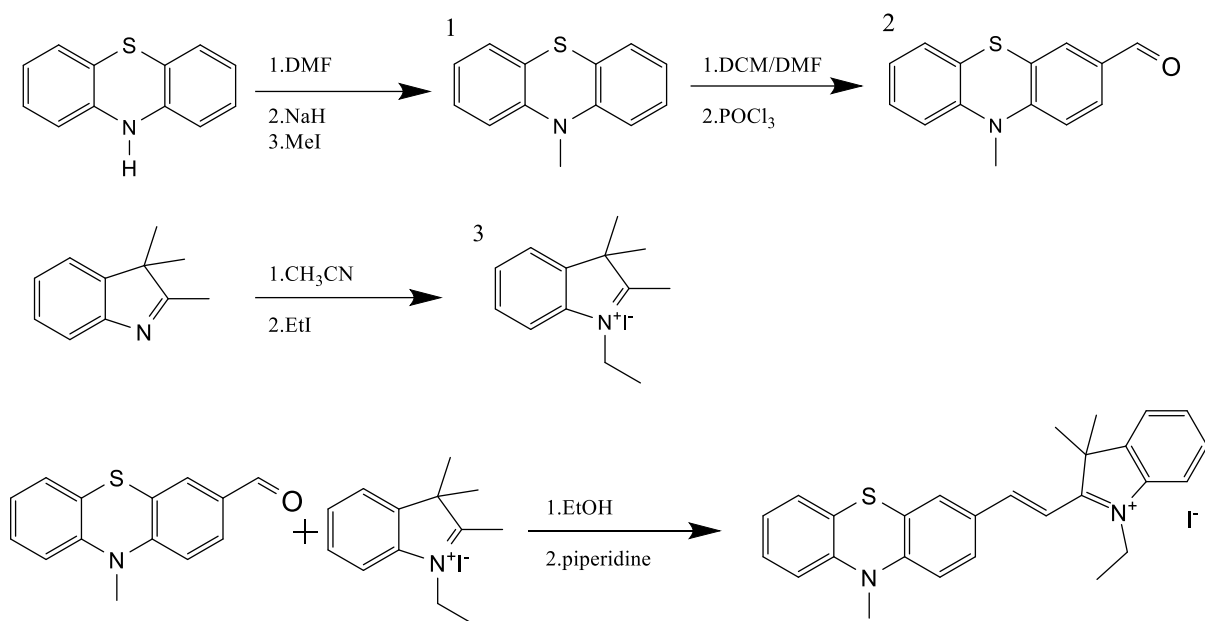
(B 組)雙氧水 250 μ L + DMPO 溶液 750 μ L 照可見光

(C 組)水 250 μ L + DMPO 溶液 750 μ L 照紫外光

(D 組)水 250 μ L + DMPO 溶液 750 μ L 照可見光

三、MPT-Cy2 合成步驟

本實驗旨在透過起始物-硫化二苯胺合成最終產物-MPT-Cy2，合成步驟圖(五):



圖(五)

(一)取 50 mL 圓底瓶，置於冰浴中，加入 20 mL 二甲基甲醯胺(DMF)，緩慢加入氫化鈉 1.0 g(60%purity, 25.1 mmol)，再加入甲基碘 1.7 mL(25.1 mmol)及硫化二苯胺 2.0 g(10.0 mmol)，於室溫中置於磁石攪拌器上轉速 135 攪拌 2 小時，將圓底瓶置於冰浴中，緩慢加入冰的去離子水以除去多餘的氫化鈉，移開冰水浴並將反應物倒入分液漏斗，重複加入 30 mL 二氯甲烷進行萃取，收集有機層後以無水硫酸鎂除水，接上減壓濃縮機進行減壓濃縮，以管柱層析(展開液比例為二氯甲烷比正己烷 1:1, Rf=0.5)，得到透明無色晶體產物 1。

(二)取 50 mL 圓底瓶，以 10 mL 二氯甲烷為溶劑，將 0.856 g(4 mmol)產物 1 與 1.56 mL(20 mmol)DMF 混和在圓底瓶中，於 0 °C 下將 2 mL(21.4 mmol)三氯氧磷緩慢滴加入混合液中，置於油浴鍋內迴流(轉速 135)攪拌 12 小時，將圓底瓶放置於冰浴中，緩慢加入冰的去離子水以除去多餘的三氯氧磷，移開冰水浴並將反應物倒入分液漏斗，重複加入 30 mL 二氯甲烷進行萃取，收集有機層後以無水硫酸鎂除水，接上減壓濃縮機進行減壓濃縮，以管柱層析(展開液比例為二氯甲烷比正己烷 1:1, Rf=0.12)及再結晶得到產物 2。

(三)取 50 mL 圓底瓶，混和 2,3,3-trimethyl-indole 3.7 g(23.3 mmol)與乙基碘 3.63 g(25.5 mmol)，加入乙腈 15 mL，置於油浴鍋，通入氫氣迴流(轉速 135)攪拌 2 小時，將圓底瓶放入冰浴中冷卻，逐漸析出粉紅色晶體，以布氏漏斗過濾去除溶液，並以約 10 毫升的乙醚清洗數次，得到產物 3。

(四)取 50 mL 圓底瓶，以乙醇為溶劑，混合 0.25g(0.45mmol)產物 2 及 0.15g(0.5mmol)產物

3，加入哌啶 0.1 mL 作為催化劑，置於油浴鍋並通入氮氣，保持迴流(轉速 135)攪拌 12 小時，得到含有 MPT-Cy2 之乙醇溶液。

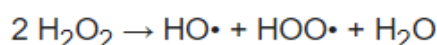
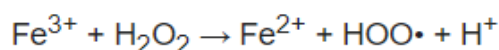
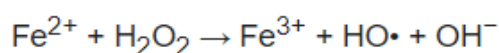
四、MPT-Cy2 純化與鑑定

合成出的產物 1 到 4 號，並利用 X-ray、ESI-MS 等儀器進行鑑定。

經合成獲得含有 MPT-Cy2 混合物溶液後，嘗試用再結晶的方式，純化出 MPT-Cy2，但是碘離子之產物難以長晶，故改採用較易長晶的 BPh₄⁻當作陰離子，來證明陽離子結構的部分正確，理論上可在結晶後將陰離子替換回碘離子，以獲得產物 MPT-Cy2。

五、產物分析

如成功合成，便可分析其物理與化學性質，本實驗將利用芬頓反應(Fenton reaction)如圖(六)，以 H₂O₂+Fe²⁺作為氫氧自由基產生來源。



圖(六)

(一)透過 EPR 對自由基濃度進行定量分析，分別配製產物莫耳數與過氧化氫莫耳數比為 1:10000、1:8000、1:5000、1:3000、1:1000 之水溶液，接下來加入亞鐵離子作為催化劑，產物與亞鐵離子莫耳數比為 1:5，為進行比較，另配一組產物與過氧化氫比例為 0:10000 之水溶液，且加入相同量之亞鐵離子。而後分別於加入雙氧水後之 0、1、2、3、4、5、7、10 及 20 分鐘後加入與雙氧水等比例之 DMPO，並將溶液以 pipetman 吸吐兩次以確保混合均勻，再以毛細管吸取溶液進行檢測，藥品劑量如圖(七)：

	亞鐵離子	去離子水		MPT-Cy2	去離子水
亞鐵離子溶液	5毫克	10毫升	MPT-Cy2溶液	1毫克	100毫升
	雙氧水	去離子水		DMPO	去離子水
雙氧水溶液	0.6427克	10毫升	DMPO溶液	0.2310克	2毫升

MPT-Cy2與過氧化氫莫耳數比	1:10000	1:8000	1:5000	1:3000	1:1000	0:10000
去離子水	250μL					500μL
MPT-Cy2溶液	250μL					0μL
亞鐵離子	10μL					
雙氧水溶液	100μL	80μL	50μL	30μL	10μL	100μL
分別計時0、1、2、3、4、5、7、10、20分鐘						
DMPO溶液	100μL	80μL	50μL	30μL	10μL	100μL

圖(七)

(二)透過 EPR 檢測自由基濃度之變化，繪製自由基濃度與時間關係圖，分析產物應用於自由基檢測相關方面之可行性。

(三)分別配製 MPT-Cy2 與過氧化氫莫耳數比為 1 : 10000、1 : 8000、1 : 5000、1 : 3000、1 : 1000 之水溶液，接下來加入亞鐵離子作為催化劑，MPT-Cy2 與亞鐵離子莫耳數比為 1 : 5，藥品劑量如圖(八):

	亞鐵離子	去離子水
亞鐵離子溶液	7.95毫克	5毫升

	雙氧水	去離子水		MPT-Cy2	去離子水
雙氧水溶液	4.3576克	5毫升	MPT-Cy2溶液	1毫克	200毫升

MPT-Cy2與過氧化氫莫耳數比	1:10000	1:8000	1:5000	1:3000	1:1000
MPT-Cy2溶液	4000μL				
亞鐵離子	10μL				
雙氧水溶液	100μL	80μL	50μL	30μL	10μL

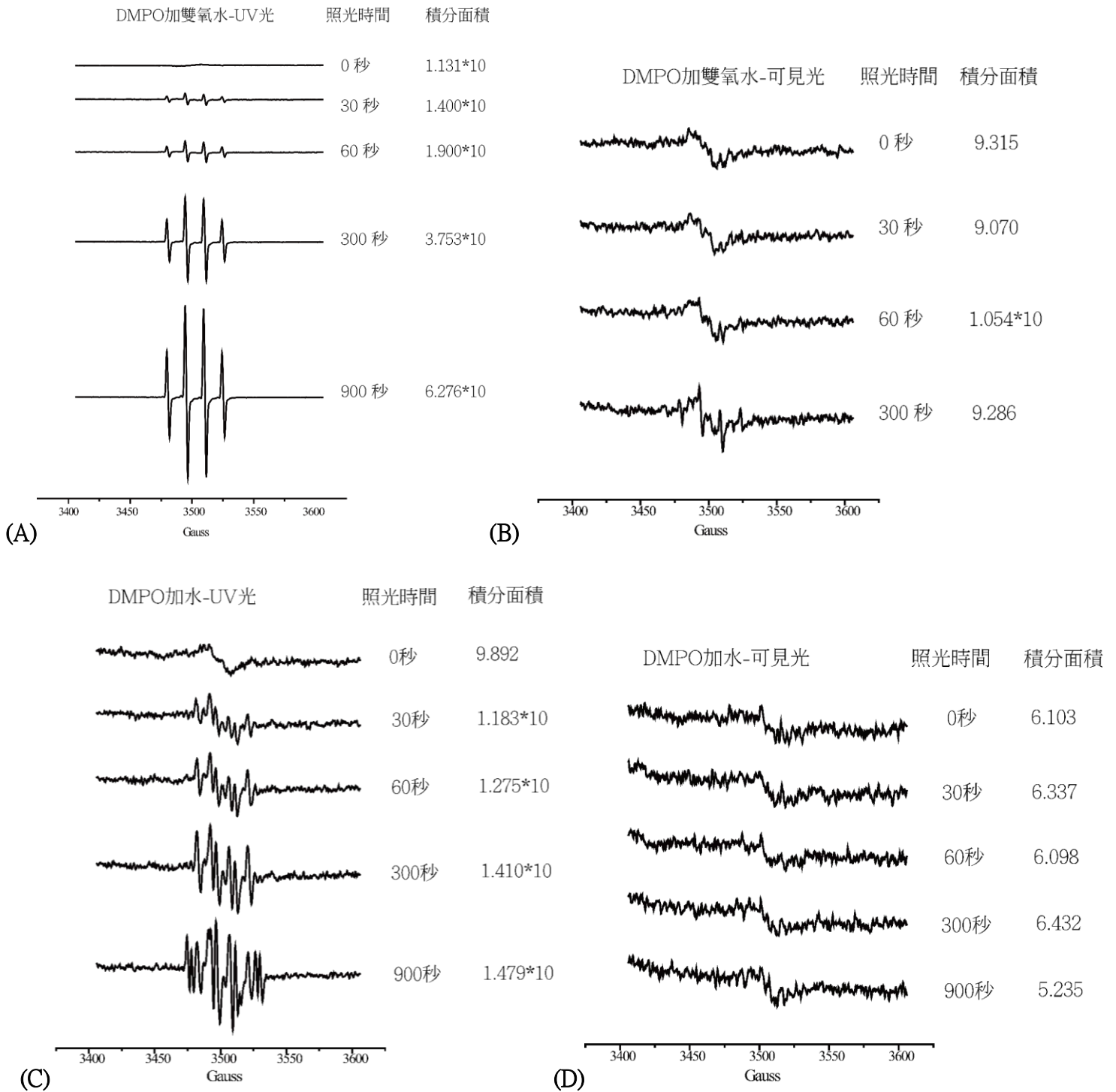
圖(八)

(四)透過紫外光可見光光譜儀(UV-Vis)檢測溶液吸收度趨勢隨時間變化，取一波長，繪製吸收度與時間關係圖進行分析。

伍、研究結果與討論

一、電子順磁共振光譜儀(EPR)檢測氫氧自由基之結果

(一)將初步數據進行一次微分所得圖形如圖(九):



圖(九)

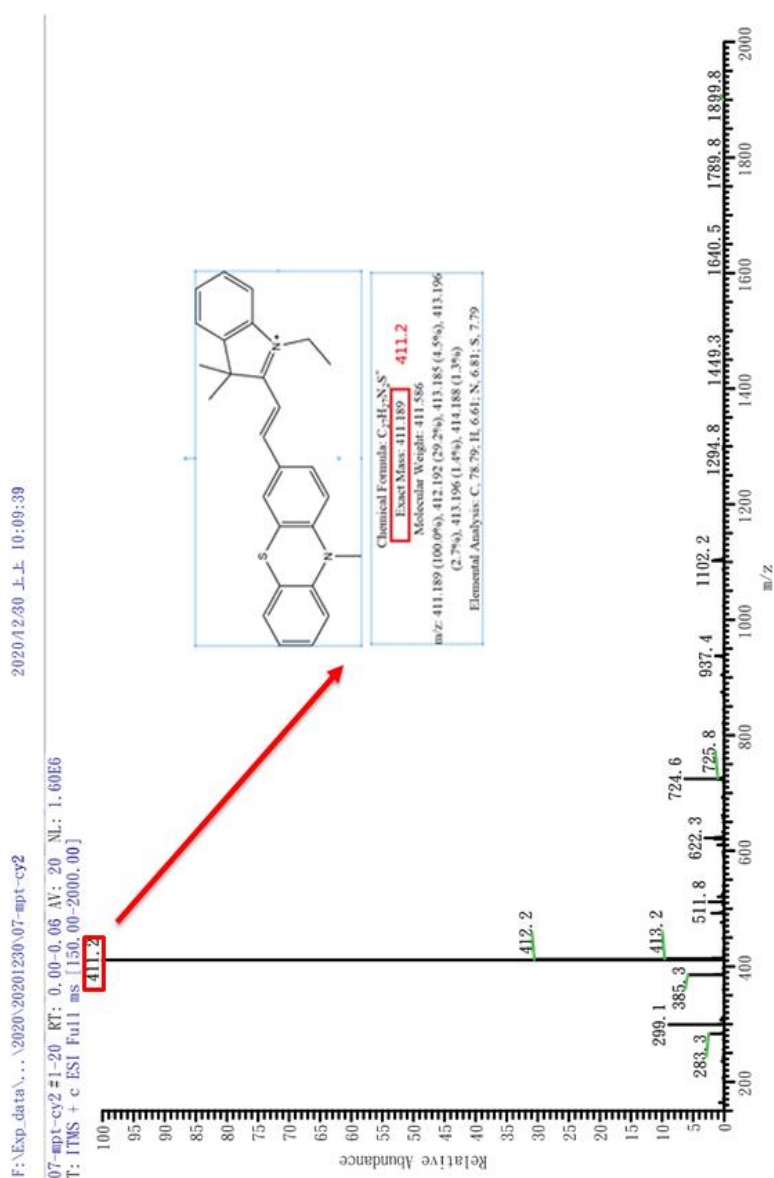
(一)圖形判別:

- 1.由 A 圖波型及積分面積可知，雙氧水照射紫外光後可偵測到較多數量的自由基。
- 2.DMPO 溶液加水的圖形(C、D)中，可看出雜訊較多，訊號較微弱，無自由基產生。
3. DMPO 溶液加雙氧水的圖形(A、B)中，可見照射紫外光之 A 組所產生的訊號明顯較照射可見光(B)強烈，積分面積值也較高，故相較於 B 組，A 組所產生之氫氧自由基較多。

(二)結果:

已知紫外光波長較可見光短、能量較大，較易於讓過氧化氫中氧與氧間的鍵結斷裂而產生氫氧自由基，與實驗結果相符。故證實 EPR 確實可做為檢測自由基種類及數量的依據。

二、電噴灑游離質譜儀(ESI-MS)對 MPT-Cy2 進行分析結果:

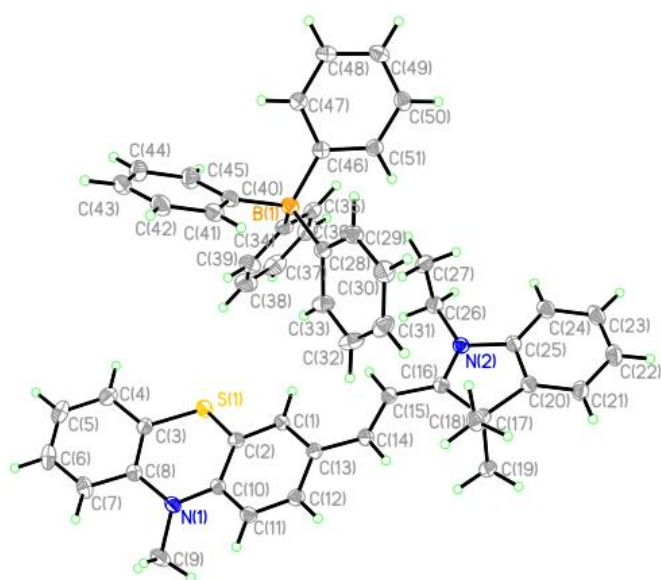


圖(十)最終產物 MPT-Cy2 之質譜光譜 (ESI-MS) 及文獻中所述 MPT-Cy2 特性

由圖(十)可得知，強烈的基峰訊號為質荷比 411.2(m/z)，與預期產物 MPT-Cy2 正離子團的質荷比幾乎吻合。但由於 ESI-MS 的偵測限制，故僅能確定產物之陽離子部分質荷比相近，無法由此得出結構式，故是否成功合成 MPT-Cy2，尚待進一步驗證。

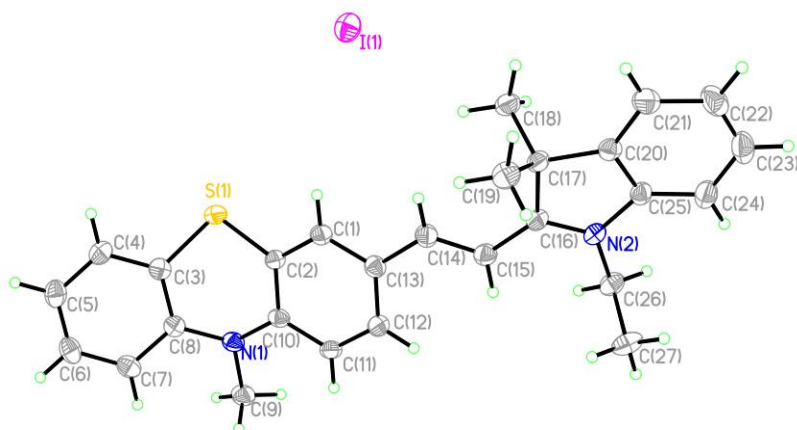
三、X 光單晶繞射儀(X-ray)分析產物 MPT-Cy2 晶體結構:

由於起初陰離子為碘離子之 MPT-Cy2 難以長晶，因此嘗試加入四苯硼鈉，將 MPT-Cy2 之陰離子替換為 BPh_4^- ，再透過將 MPT-Cy2- BPh_4^- 溶於二氯甲烷，並疊入與溶液體積比約為 2 : 1 的正己烷，使其再結晶，獲得黑色扁平狀之 MPT-Cy2- BPh_4^- 晶體，將 MPT-Cy2- BPh_4^- 以 X 光單晶繞射儀(X-ray)進行檢測，結果如圖(十一)，MPT-Cy2 陽離子部分之結構相符。



圖(十一)MPT-Cy2- BPh_4^- 之晶體結構

但我們發現，在將碘離子產物靜置一個月後，也可使其結晶。在取出晶體以正己烷沖洗後，可得產物 MPT-Cy2 晶體(紫色且具有金屬光澤)，進行下一步分析。

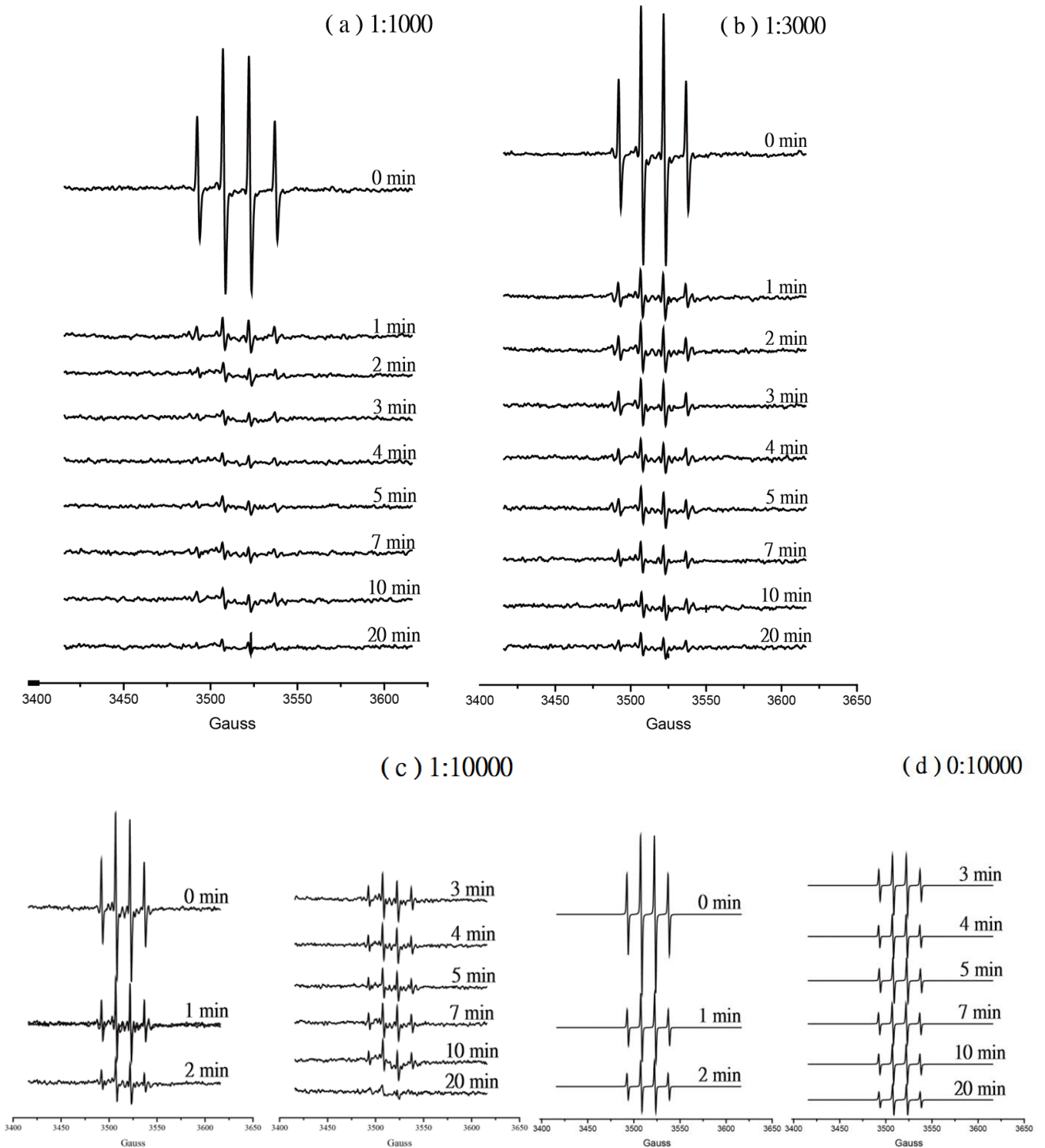


圖(十二)

由圖(十二)可知，產物 MPT-Cy2 晶體結構與論文(Sun et al., 2014)²所描述相同，可證明 MPT-Cy2 已被合成。

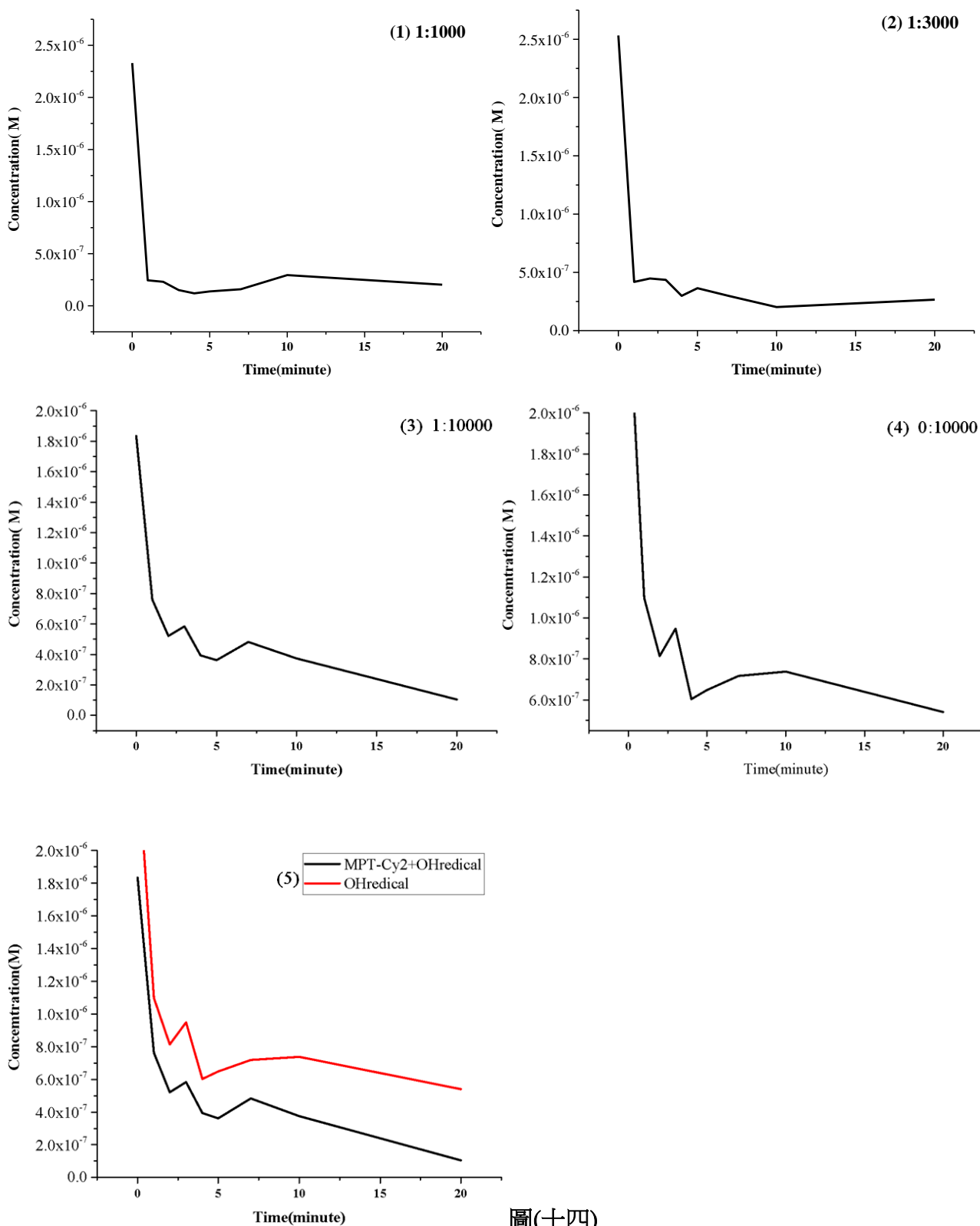
四、電子順磁共振光譜儀(EPR)測驗結果

(一)將不同 MPT-Cy2 與過氧化氫莫耳數比之水溶液以 EPR 進行檢測，結果如圖(十三):



圖(十三)

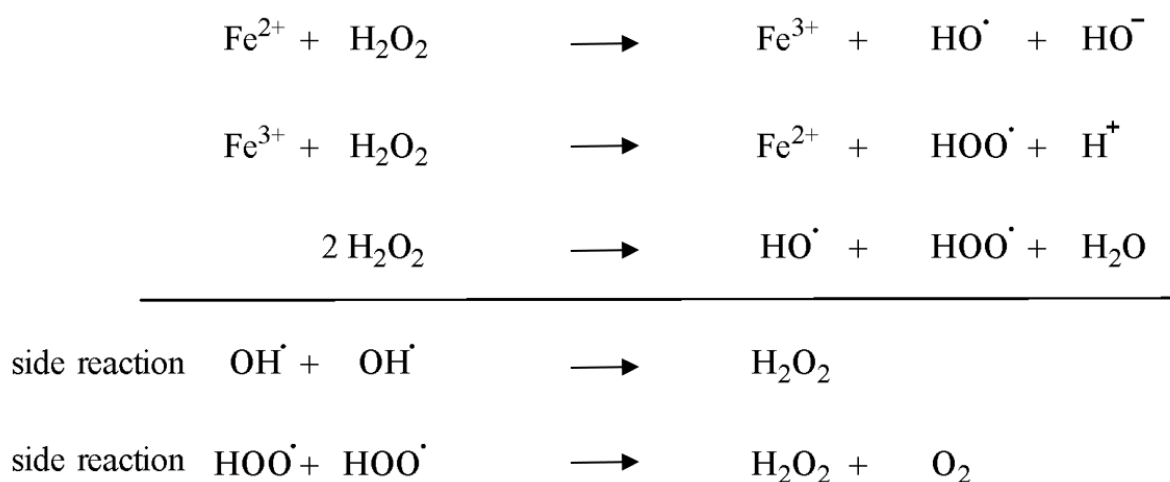
透過將 EPR 初步數據進行一次微分所得出的積分值，利用電腦加以理論計算後，可得樣品之自由基濃度，繪製自由基濃度與時間關係圖如圖(十四):



圖(十四)

1.由圖(十三)、(十四)可看出，經過大約一分鐘，氫氧自由基的濃度便大幅衰減，之後的濃度才會呈現較穩定的狀態，故後續的 UV-Vis 光譜實驗，我們採用反應一分鐘後的樣品數據進行討論。

2.由圖(十四)可知，氫氧自由基會自行降解消失，使氫氧自由基在極短的時間內降至較低濃度，此現象可證明由芬頓反應產生之氫氧自由基並不穩定，推測可能是由於產生之自由基會進行副反應，如圖(十五)，造成自由基的生成量受到影響。

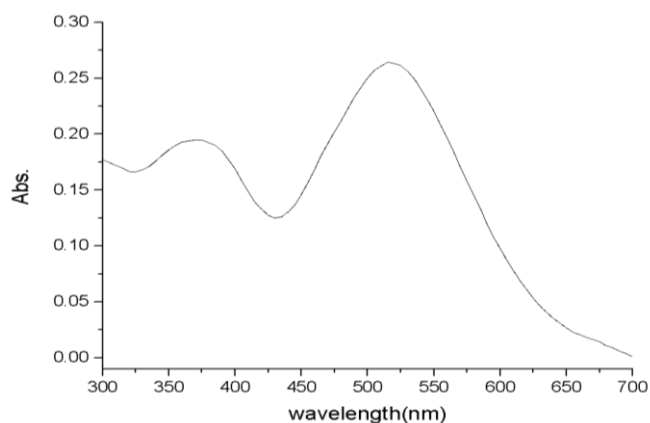


圖(十五)

3.自由基雖會自行降解，但若取 MPT-Cy2 與過氧化氫莫耳數比 1 : 10000 與未加入 MPT-Cy2 之數據製成圖(十四)之(5)，進行比較，在相同氫氧自由基莫耳數下，未加入 MPT-Cy2 之樣品(紅線)之自由基濃度皆較加入 MPT-Cy2 之樣品(黑線)高，且紅線與黑線的下降趨勢相近。此現象可證實 MPT-Cy2 與自由基確有結合反應發生。

五、紫外光可見光光譜儀(UV-Vis)檢測結果

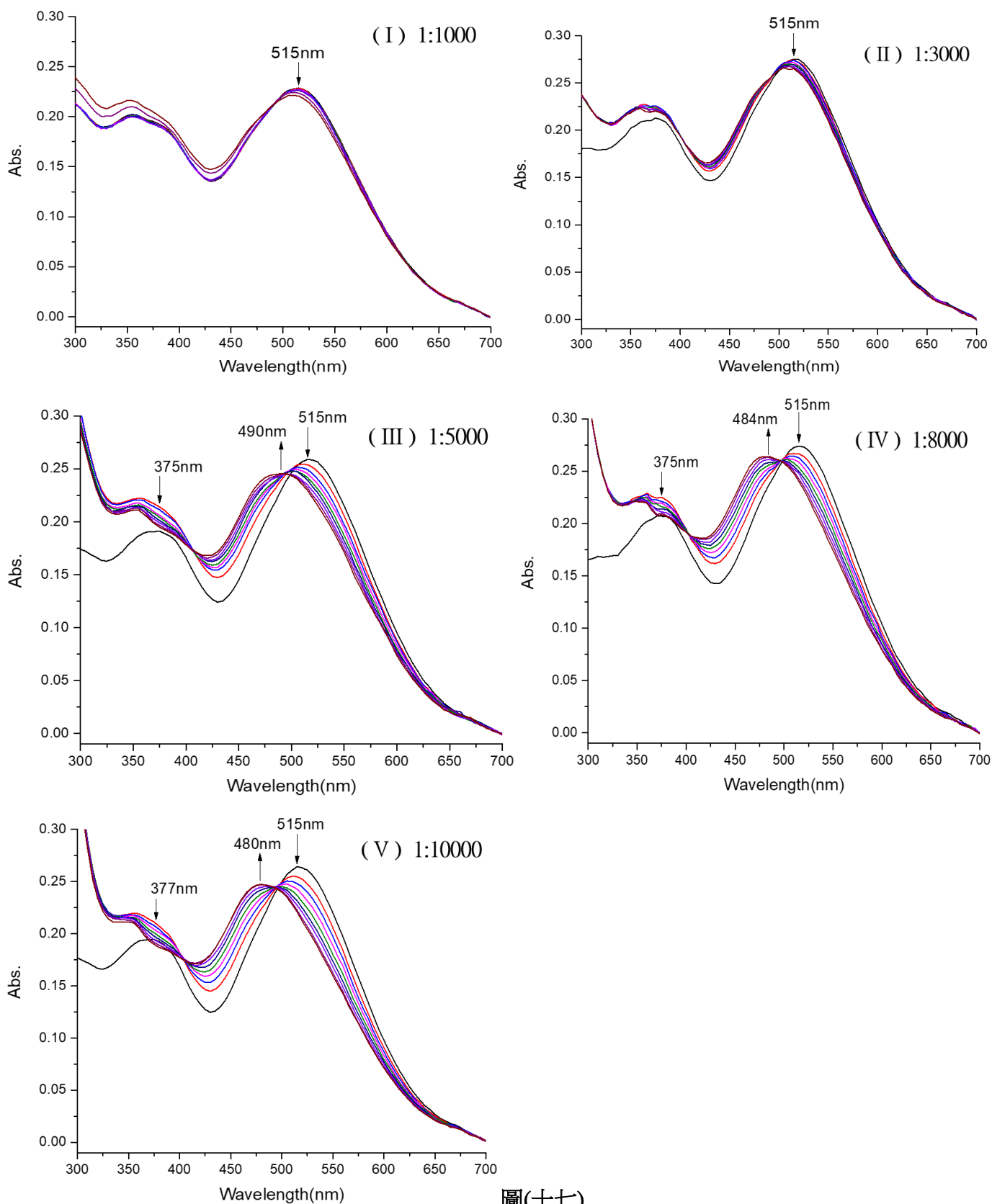
(一)MPT-Cy2 水溶液之 UV-Vis 光譜結果如圖(十六)所示:



圖(十六)

由圖(十六)可知，MPT-Cy2 水溶液之 UV-Vis 光譜圖吸收度波峰波長約為 515nm 及 350nm 左右。

(二)配製 MPT-Cy2 與過氧化氫莫耳數比 1 : 1000、1 : 3000、1 : 5000、1 : 8000、1 : 10000 之水溶液，以 UV-Vis 每 2.5 分鐘檢測一次，總共檢測 20 分鐘，光譜結果如圖 (十七)。



圖(十七)

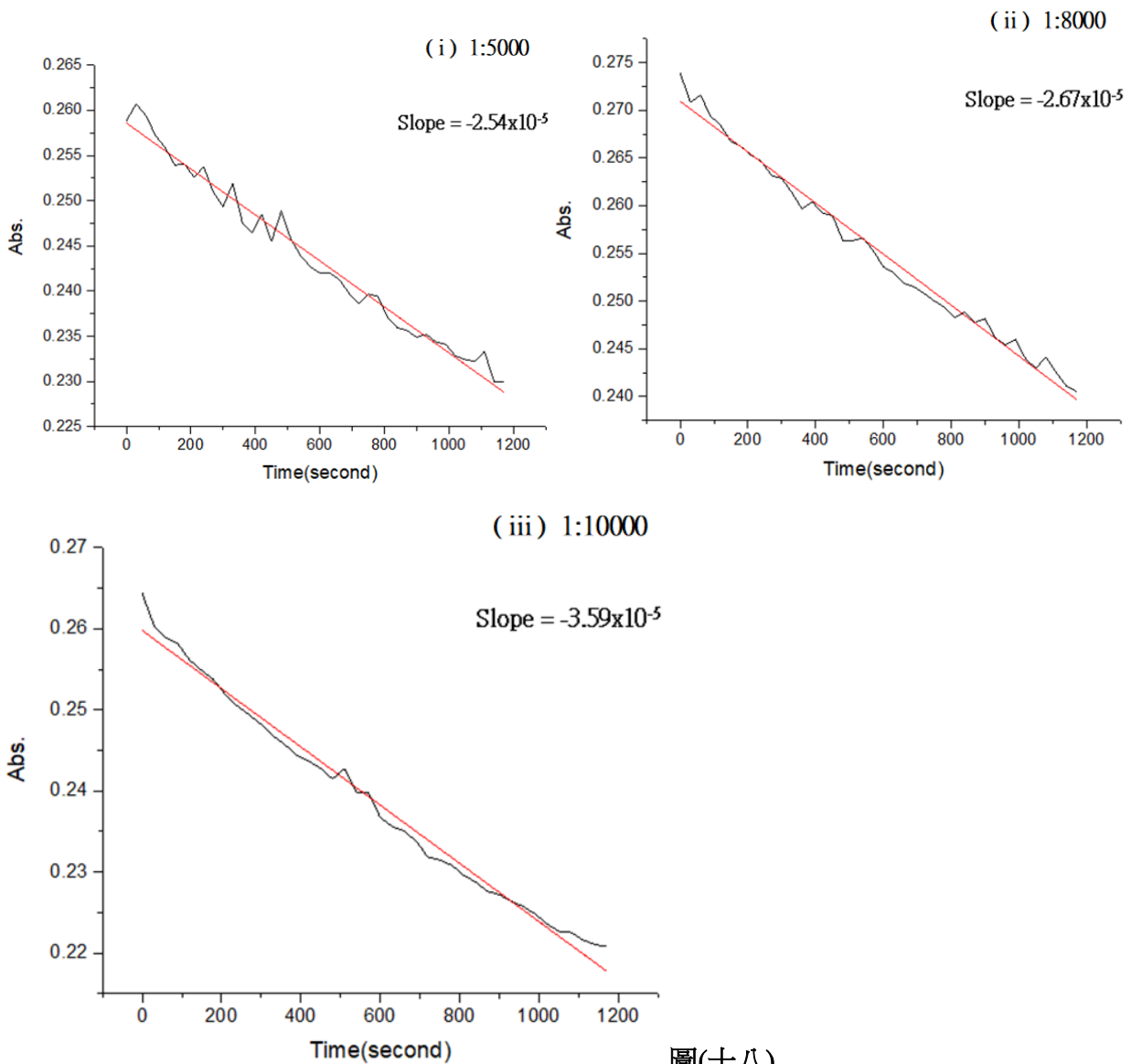
1.由(III)、(IV)、(V)可知，MPT-Cy2 在加入雙氧水與亞鐵離子的混合溶液後，波長 515nm 之吸收度有明顯下降趨勢，而波長 480-490nm 之吸收度則上升成為波峰，與文獻(Liu et al., 2016)中所述相近，此吸收度變化是 MPT-Cy2 與氫氧自由基反應造成的結果。

2.而(IV)、(V)可明顯觀察出，反應過程中，所有光譜線具有兩個共同交點，此交點為等吸收點，而當反應進行時，如反應過程中所得光譜具有等吸收點，則表示此反應並無其他副產物產生，故由此現象可得知，MPT-Cy2 與氫氧自由基之反應並無其他副產物的產生。

3.由圖(I)、(II)可看出，在 MPT-Cy2 與過氧化氫莫耳數比例 1:1000 及 1:3000 的條件下，光譜變化並不顯著，由此可知，MPT-Cy2 與過低濃度的氫氧自由基之反應並不明顯。故後續僅定量分析 1:5000 以上的樣品數據。

(二)繪製吸收度波峰與時間關係圖

由上述 UV-Vis 光譜，取吸收波長 515nm，記錄過程吸收度變化，繪製吸收度波峰與時間關係圖，如圖(十八):

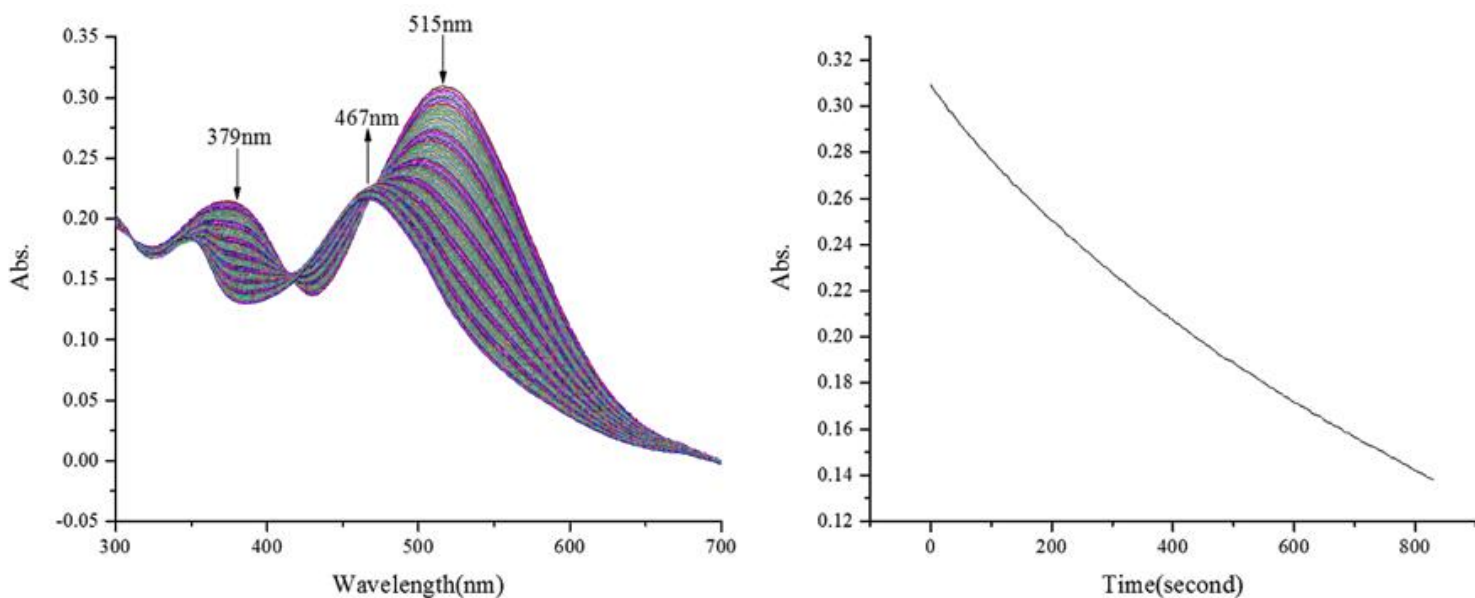


圖(十八)

由圖(十八)可知，波長 515nm 之吸收度皆隨時間增加而遞減，且變化趨勢呈斜直線，顯示 MPT-Cy2 與氫氧自由基應有持續作用，且由斜率絕對值觀察可發現，過氧化氫比例愈高時，MPT-Cy2 與氫氧自由基之反應愈快。

(三)MPT-Cy2 與氫氧自由基之反應續航性之探討

為探討 MPT-Cy2 與氫氧自由基之反應續航性，我們取 MPT-Cy2 與過氧化氫莫耳數比 1 : 10000 之水溶液，將反應時間延長至 830 分鐘，而其 UV-Vis 光譜圖，如圖(十九)之(左)，及其吸收度波峰與時間關係圖，如圖(十九)之(右):



MPT-Cy2 + OH radical

圖(十九)

由圖(十九)可知，MPT-Cy2 與氫氧自由基之反應在 830 分鐘後仍持續作用。

陸、結論

- 一、本實驗成功利用硫化二苯胺合成 MPT-Cy2，並以 ESI-MS、X-ray 證明其結構無誤。
- 二、實驗第二部分我們利用過氧化氫溶液與亞鐵離子產生芬頓反應一分鐘後，作為穩定氫氧自由基的來源，以進行後續 MPT-Cy2 與自由基結合反應的檢測步驟。
- 三、利用電子順磁共振光譜儀(EPR)檢測，證實 MPT-Cy2 與自由基產生結合反應。
- 四、利用 UV-Vis 光譜儀檢測，MPT-Cy2 水溶液之光譜圖吸收度波峰波長為 515nm 及 350nm，加入氫氧自由基反應後，波長 515nm 之吸收度下降，而波長 480~490nm 之吸收度則上升，顯示 MPT-Cy2 能與自由基發生結合反應。
- 五、當 MPT-Cy2 與過氧化氫之比例為 1 : 5000 以上時，MPT-Cy2 與自由基能產生明顯的反應效果。
- 六、定量分析波長 515nm 吸收度變化與時間關係圖，結果顯示當 MPT-Cy2 與過氧化氫之比例愈高時，吸收度變化也愈大，表示自由基濃度愈高時，MPT-Cy2 與其反應速率也愈快。
- 七、由未加入 MPT-Cy2 之樣品之 EPR 光譜可觀察到，經由芬頓反應產生的氫氧自由基會於一分鐘內大幅衰減，此 EPR 光譜可證明芬頓反應在初期時所產生之氫氧自由基並不穩定，因此，被生化實驗普遍採用的芬頓反應能否作為穩定氫氧自由基之來源，值得做進一步的研究與探討。

柒、未來展望

未來我們將嘗試改變 MPT-Cy2 之官能基，加快 MPT-Cy2 與氫氧自由基之反應速率、增強其反應性與對氫氧自由基之敏感度，並增加顏色變化、螢光變化.....，利用 EPR 進行比較、改善，進一步製成自由基試劑。

另一方面，因 MPT-Cy2 具有與自由基反應之續航力，可長時間穩定的消除自由基，故在未來，我們也可以嘗試將 MPT-Cy2 往自由基消除劑的方向進行研究。

捌、參考資料

- 一、Liu, F., Du, J., Song, D., Xu, M., & Sun, G. (2016). A sensitive fluorescent sensor for the detection of endogenous hydroxyl radicals in living cells and bacteria and direct imaging with respect to its ecotoxicity in living zebra fish [10.1039/C5CC10658C]. *Chemical communications*, 52(25), 4636-4639.
<https://doi.org/10.1039/C5CC10658C>
- 二、Sun, M., Wang, S., Yang, Q., Fei, X., Li, Y., & Li, Y. (2014). A new colorimetric fluorescent] sensor for ratiometric detection of cyanide in solution, test strips, and in cells[10.1039/C3RA46741D]. *RSC Advances*, 4(16), 8295-8299.
<https://doi.org/10.1039/C3RA46741D>
- 三、Shinde, D. B., Salunke, J. K., Candeias, N. R., Tinti, F., Gazzano, M., Wadgaonkar, P. P., Priimagi, A., Camaioni, N., & Vivo, P. (2017, 2017/04/12). Crystallisation-enhanced bulk hole mobility in phenothiazine-based organic semiconductors. *Scientific Reports*, 7(1), 46268.
<https://doi.org/10.1038/srep46268>
- 四、Miyazaki, T., Shibahara, M., Fujishige, J.-i., Watanabe, M., Goto, K., & Shinmyozu, T. (2014, 2014/12/05). Synthesis and Electronic and Photophysical Properties of [2.2]- and [3.3]Paracyclophane-Based Donor - Donor - Acceptor Triads. *The Journal of Organic Chemistry*, 79(23), 11440-11453.
<https://doi.org/10.1021/jo5020273>
- 五、Shinde, D. B., Salunke, J. K., Candeias, N. R., Tinti, F., Gazzano, M., Wadgaonkar, P. P., Priimagi, A., Camaioni, N., & Vivo, P. (2017, 2017/04/12). Crystallisation-enhanced bulk hole mobility in phenothiazine-based organic semiconductors. *Scientific Reports*, 7(1), 46268. <https://doi.org/10.1038/srep46268>

【評語】 050201

本研究由硫化二苯胺合成出 MPT-Cy2，並由電噴灑游離質譜儀(ESI-MS)與 X 光單晶繞射儀(X-ray)證實其結構無誤。再利用過氧化氫與亞鐵離子進行芬頓反應(Fenton Reaction)，形成氫氧自由基，探討 MPT-Cy2 與氫氧自由基反應之特性。實驗結果顯示，在電子順磁共振光譜儀(EPR)與紫外光可見光光譜儀(UV-Vis)的光譜圖上，皆可證實 MPT-Cy2 確能與氫氧自由基產生結合反應。其中 MPT-Cy2 與過氧化氫之莫耳數比例為 1 : 10000 時反應速率最快，且結合反應能持續至 830 分鐘，未來可望作為活性氧類(ROS)指示劑。

優點

1. 製備及鑑定都需要技術。

缺點

1. 在查找文獻後，已知 MPT-Cy2 可與氫氧自由基反應，產生螢光，因此新穎性稍低。
2. 分別配製 MPT-Cy2 與過氧化氫莫耳數比為 1 : 10000、1 : 8000、1 : 5000、1 : 3000、1 : 1000 之水溶液，接下來加入亞鐵離子作為催化劑，MPT-Cy2 與亞鐵離子莫耳數比為 1 : 5。當然 MPT-Cy2 與過氧化氫之莫耳數比例為 1 : 10000 時反應速率最快，因濃度最高。又

這樣觀察到的反應速率指的是 MPT-Cy2 與過氧化氫之反應速率還是自由基產生速率要討論。

問題

1. 未來將嘗試改變 MPT-Cy2 之官能基，加快 MPT-Cy2 與氫氧自由基之反應速率、增強其反應性與對氫氧自由基之敏感度，並增加顏色變化、螢光變化.....，利用 EPR 進行比較、改善，進一步製成自由基試劑。請問目的為何？如何改造？
2. 另一方面，因 MPT-Cy2 具有與自由基反應之續航力，可長時間穩定的消除自由基，故在未來，我們也可以嘗試將 MPT-Cy2 往自由基消除劑的方向進行研究。應用何處？生物相容性要考慮嗎？
3. 本研究 sample 是否與芬頓法的金屬鐵競爭氫氧自由基(選擇性)？
4. 本研究反應(完成)時間與成本價格(綠色化學)與一般自由基反應試劑差異(DMSO)？

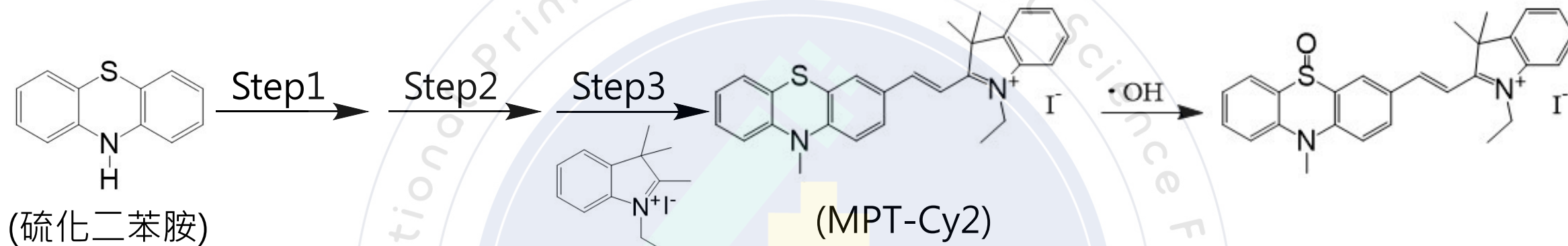
作品簡報

探討MPT-Cy2作為活性氧類(ROS)指示劑之利用

高中職組

化學科

前言



圖一、MPT-Cy2合成流程圖以及與氫氧自由基結合之結構式

1. 文獻提出MPT-Cy2在與氫氧自由基反應過後，會產生如顏色及吸收光譜改變等變化。
2. 希望能將此化合物應用於自由基的檢測，透過觀察MPT-Cy2與氫氧自由基反應後吸收光譜的變化，便可得知待測物自由基濃度。
3. 合成、純化MPT-Cy2，再進一步鑑測MPT-Cy2在不同過氧化氫濃度下的反應性，由此探討MPT-Cy2作為活性氧類(ROS)指示劑的可能性。

研究方法

合成MPT-Cy2

純化

製備自由基

分析

合成MPT-Cy2

取起始物
phenothiazine
+ NaH + CH₃I
置於室溫攪拌2小時
得**產物1**

取**產物1**
+ CHCl₃ + DMF
於0°C滴加POCl₃
回流攪拌12小時
得**產物2**

取2,2,3-trimethyl-indole
+ CHCl₃ + acetonitrile
回流攪拌12小時
冷卻至常溫並析出**產物3**

取**產物2** + **產物3** +
催化劑piperidine
回流攪拌12小時

純化

加入四苯硼鈉，將MPT-Cy2之陰離子替換為BPh₄⁻使其再結晶，獲得黑色扁平狀MPT-Cy2- BPh₄晶體

碘離子產物靜置一段時間使其結晶，並取出晶體以正己烷沖洗，得紫色具金屬光澤的MPT-Cy2晶體

製備自由基

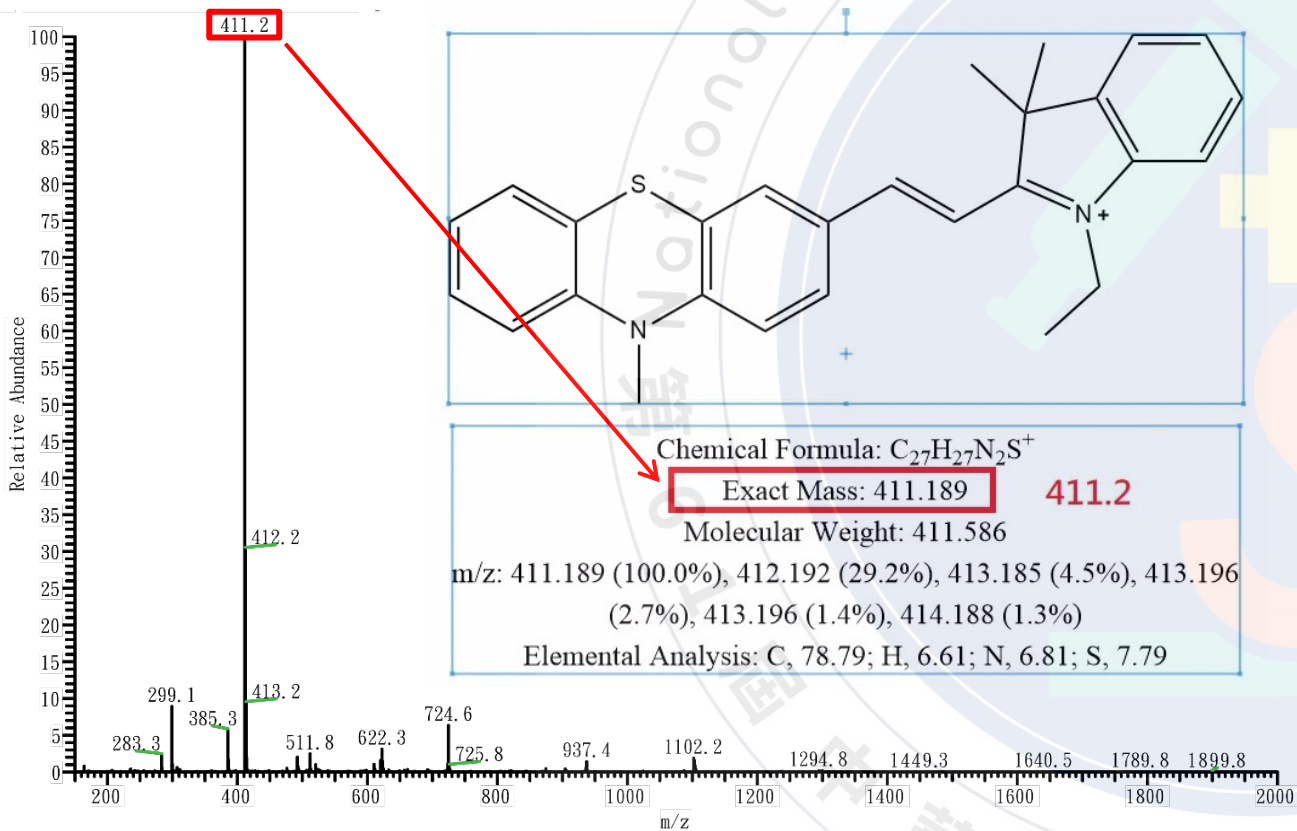
利用芬頓反應製備氫氧自由基： $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{HO}^-$

分析

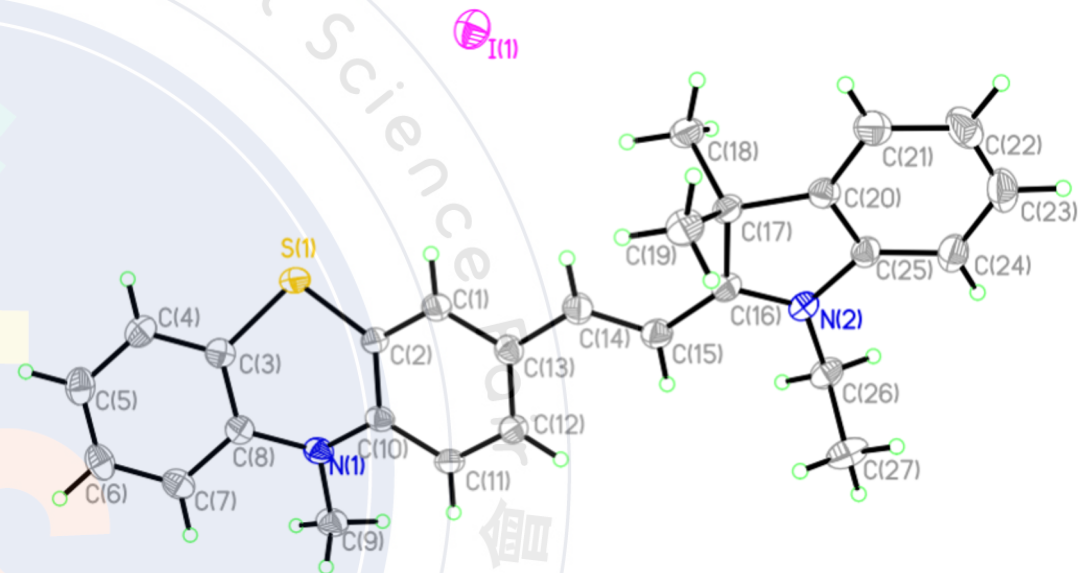
以電子順磁共振光譜儀(EPR)分析MPT-Cy2對自由基所產生的反應

以紫外光可見光光譜儀(UV-Vis)分析MPT-Cy2對自由基所產生的反應

結果與討論-以ESI-MS、X-ray確認產物

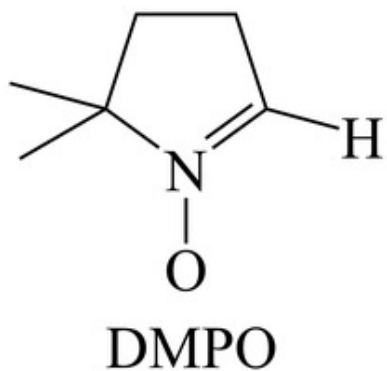


圖二、MPT-Cy2之ESI-MS檢測結果

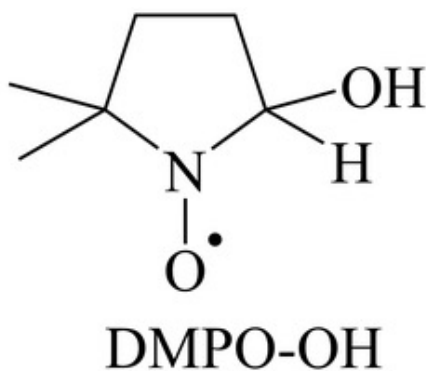


- (一)將產物靜置使其結晶，可得紫色且具有金屬光澤之晶體，以X-ray確認產物晶體結構無誤。
- (二)ESI-MS有一強烈的基峰訊號在質荷比411.2(m/z)處，與預期產物MPT-Cy2正離子團的質荷比吻合。

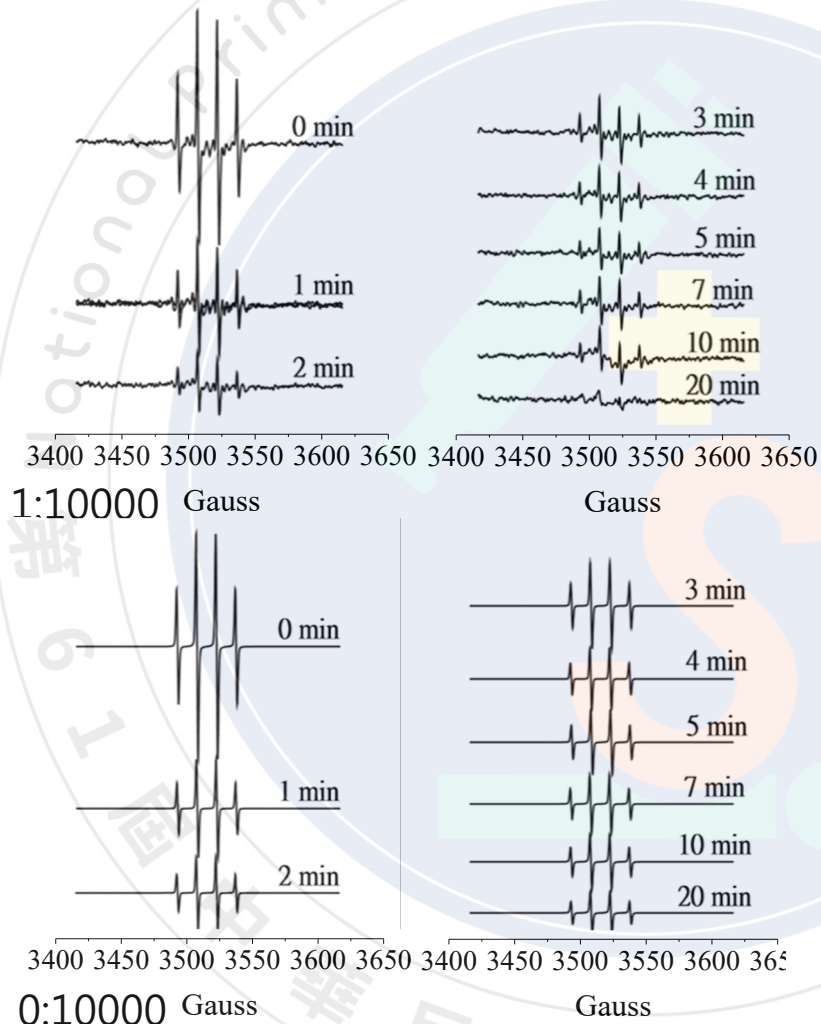
結果與討論-EPR檢測MPT-Cy2與OH·的結合



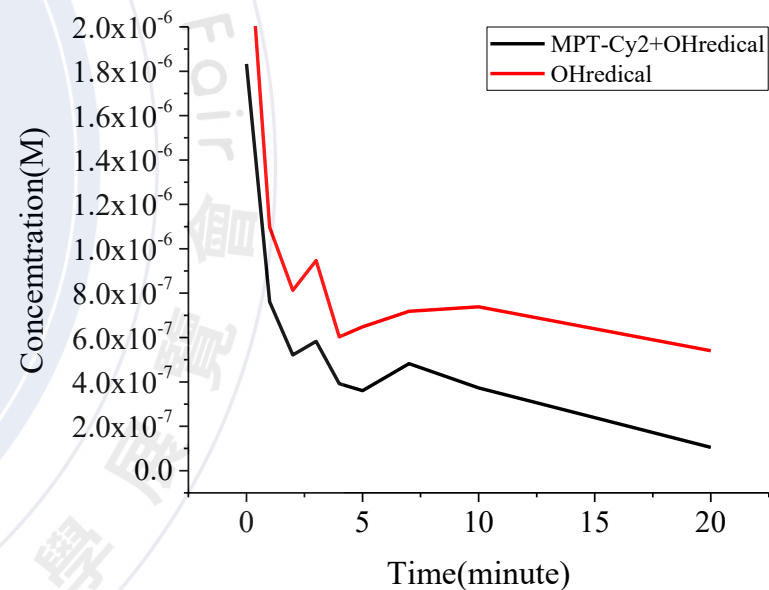
圖四、DMPO結構式



圖五、DMPO-OH結構式

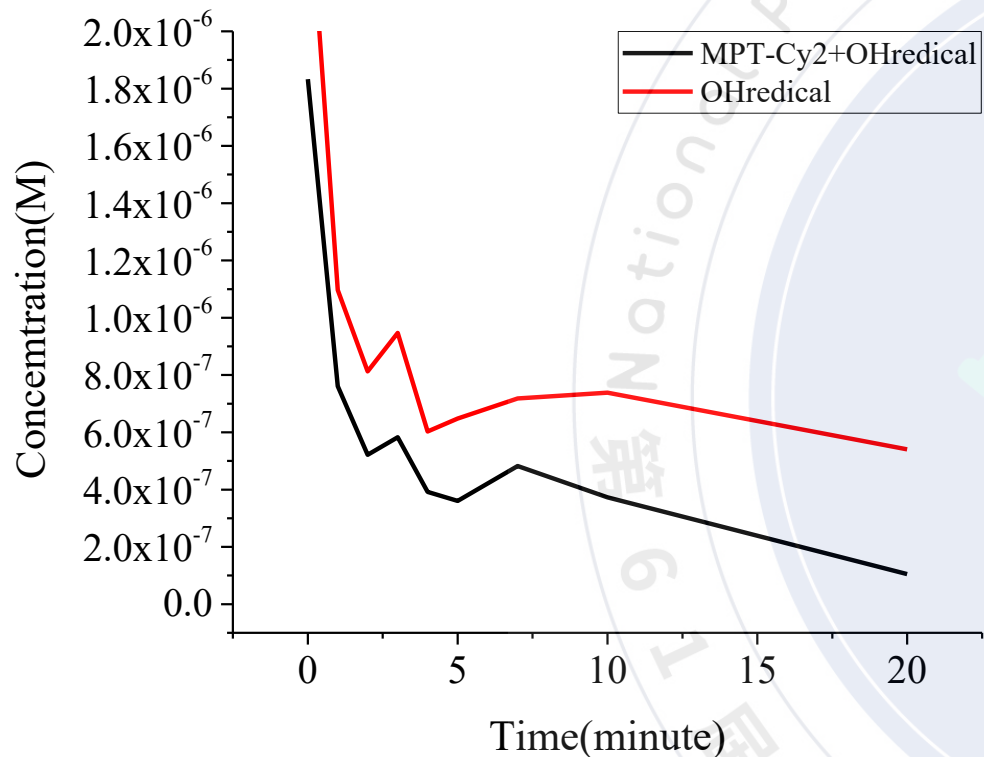


圖六、MPT-Cy2與過氧化氫莫耳數比1:10000與0:10000之EPR檢測結果



圖七、將兩組EPR檢測結果微分並合併對時間之關係圖

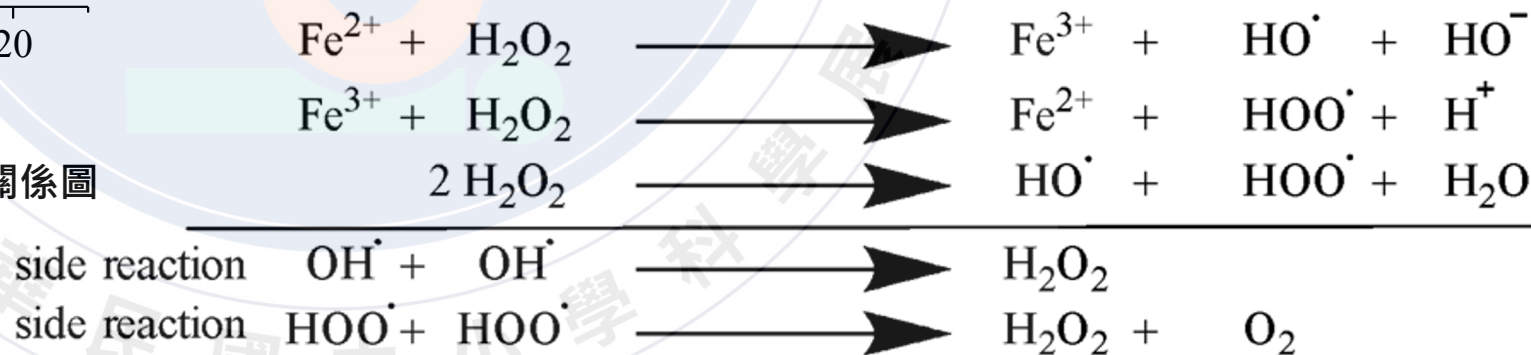
結果與討論-EPR檢測MPT-Cy2與OH·的結合



圖七、將兩組EPR檢測結果微分並合併對時間之關係圖

(一)相同氫氧自由基莫耳數下，未加入MPT-Cy2之樣品(紅線)之自由基濃度皆較加入MPT-Cy2之樣品(黑線)高，可證實MPT-Cy2與自由基確有結合反應發生。

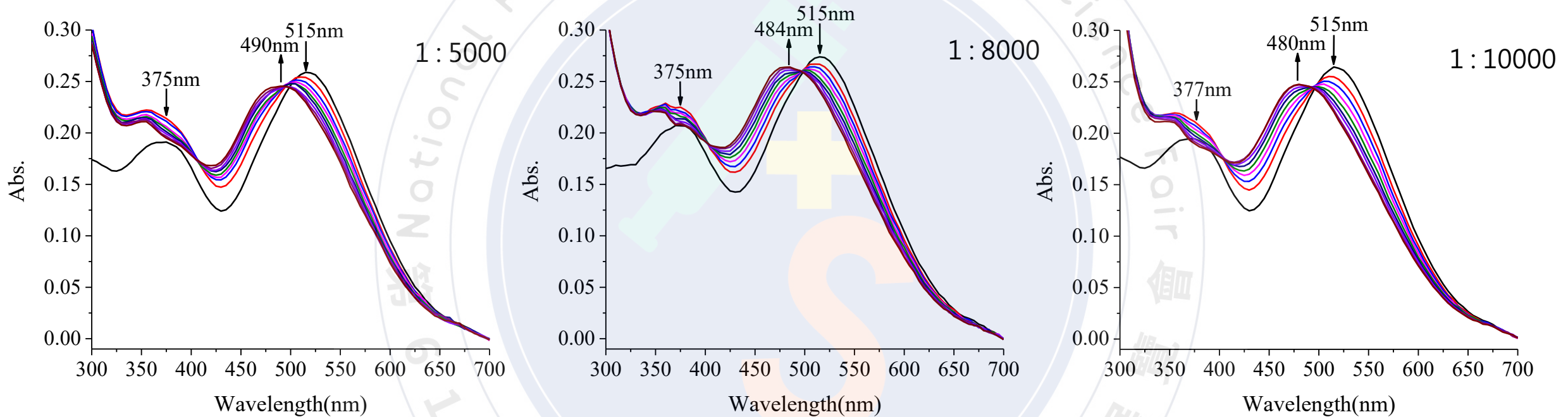
(二)氫氧自由基會在極短的時間內降至較低濃度，顯示由芬頓反應產生之氫氧自由基並不穩定，推測是由於產生另外的副反應，造成自由基的生成量受到影響。



圖八、芬頓反應之反應式以及所推測之副反應

結果與討論-利用UV-Vis檢測結合結果

(一) MPT-Cy2水溶液與氫氧自由基反應過程之UV-Vis光譜結果(圖示為MPT-Cy2莫耳數：過氧化氫莫耳數)

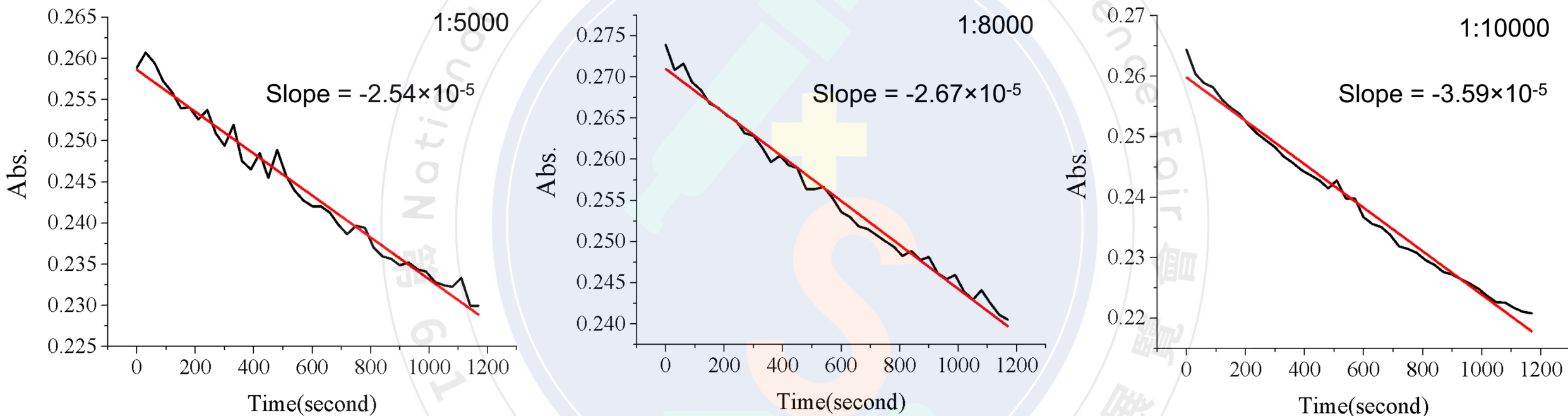


圖九、MPT-Cy2與過氧化氫不同莫耳數比反應之UV-Vis檢測結果

1. MPT-Cy2水溶液之UV-Vis光譜圖原吸收度波峰波長約為515nm及350nm左右，而加入雙氧水與亞鐵離子的混合溶液後，吸收度波峰變化與文獻中所述相近，為MPT-Cy2與氫氧自由基反應造成的結果。
2. 所有光譜線具有兩個共同交點，交點為等吸收點，表示MPT-Cy2與氫氧自由基之反應並無其他副產物產生。

結果與討論-UV-Vis吸收度變化對時間的關係

(二)吸收波長515nm之UV-Vis光譜吸收度波峰與時間關係圖(圖示為MPT-Cy2莫耳數 : 過氧化氫莫耳數)

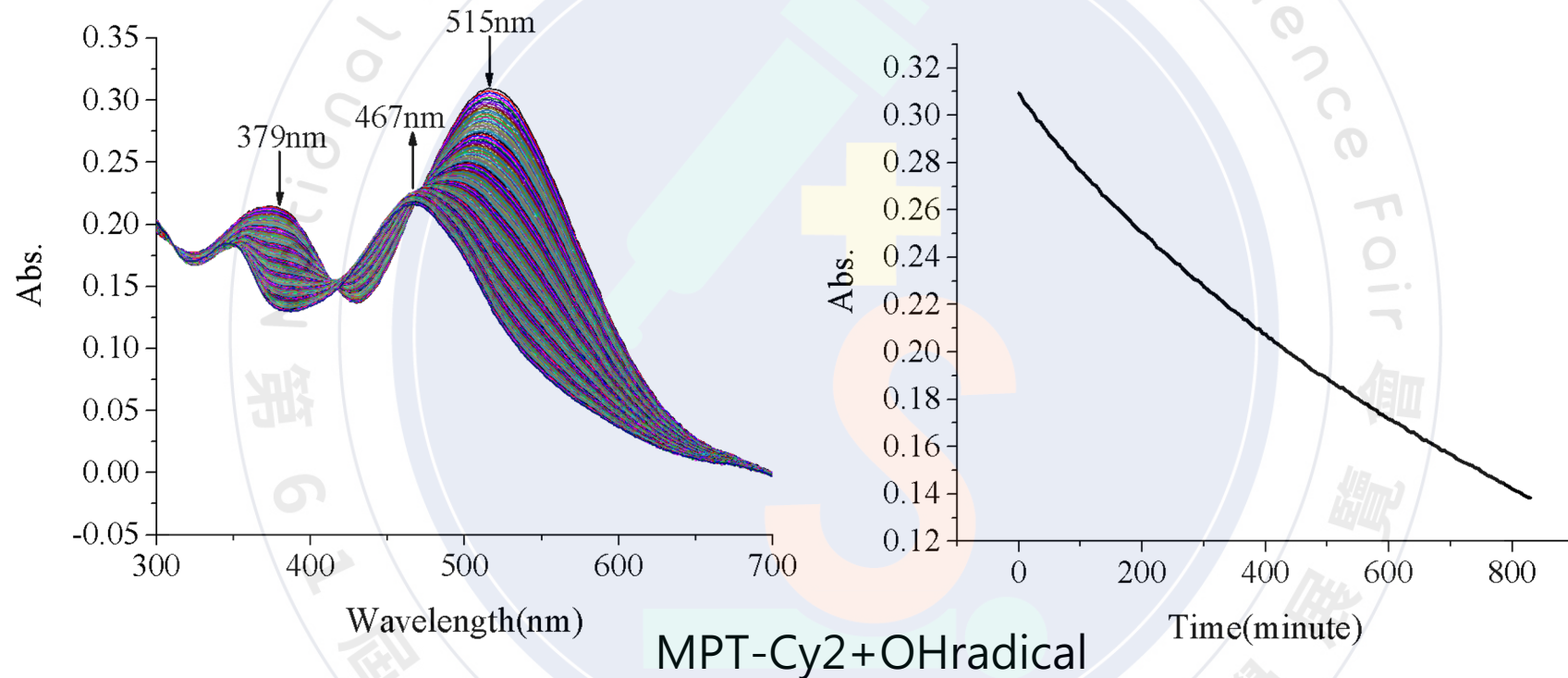


圖十、MPT-Cy2與過氧化氫不同莫耳數比之UV-Vis光譜圖中515奈米處吸收度變化對時間關係圖

結果顯示，波長515nm之吸收度隨時間增加而遞減，且變化趨勢呈斜直線，代表MPT-Cy2與氫氧自由基有持續作用，且由斜率絕對值觀察可發現，過氧化氫比例愈高，MPT-Cy2與氫氧自由基之反應速率愈快。

結果與討論-反應續航性之探討

(三) MPT-Cy2與氫氧自由基之反應續航性之探討



圖十一、左：MPT-Cy2與過氧化氫莫耳數比1:10000之UV-Vis光譜圖

右：MPT-Cy2與過氧化氫莫耳數比1:10000之UV-Vis光譜圖515奈米處吸收度變化對時間關係圖

結果顯示，MPT-Cy2與氫氧自由基之反應在830分鐘後仍持續作用。

結論

- 一、本實驗成功利用硫化二苯胺合成MPT-Cy2，並以ESI-MS、X-ray證明其結構無誤。
- 二、利用電子順磁共振光譜儀(EPR)檢測，證實MPT-Cy2與自由基產生結合反應。
- 三、MPT-Cy2水溶液之UV-Vis光譜圖吸收度波峰波長為515nm及350nm，加入氫氧自由基反應後，波長515nm之吸收度下降、波長480~490nm之吸收度上升，顯示MPT-Cy2能與自由基發生結合反應。
- 四、當MPT-Cy2與過氧化氫之比例為1：5000以上時，MPT-Cy2與自由基能產生明顯的反應效果。
- 五、結果顯示MPT-Cy2與過氧化氫之比例與UV-Vis吸收度變化呈正相關，表示自由基濃度與兩者反應速率也呈正相關。
- 六、EPR光譜中氫氧自由基濃度會於一分鐘內大幅衰減，表示初期時所產生之氫氧自由基並不穩定，因此，芬頓反應能否作為穩定氫氧自由基之來源，值得做進一步的研究與探討。

未來展望

- 一、嘗試改變MPT-Cy2之官能基，加快MPT-Cy2與氫氧自由基之反應速率、增強其反應性與對氫氧自由基之敏感度，並增加顏色變化、螢光變化.....，利用EPR進行比較、改善，進一步製成自由基試劑，並嘗試將其運用於細胞內或可能產生自由基的物質上。
- 二、可利用MPT-Cy2具有的消除自由基之續航力，往自由基消除劑的方向進行研究。

參考資料

- 一、Liu, F., Du, J., Song, D., Xu, M., & Sun, G. (2016). A sensitive fluorescent sensor for the detection of endogenous hydroxyl radicals in living cells and bacteria and direct imaging with respect to its ecotoxicity in living zebra fish [10.1039/C5CC10658C]. *Chemical communications*, 52(25), 4636-4639. <https://doi.org/10.1039/C5CC10658C>
- 二、Sun, M., Wang, S., Yang, Q., Fei, X., Li, Y., & Li, Y. (2014). A new colorimetric fluorescent sensor for ratiometric detection of cyanide in solution, test strips, and in cells[10.1039/C3RA46741D]. *RSC Advances*, 4(16), 8295-8299.
- 三、Shinde, D. B., Salunke, J. K., Candeias, N. R., Tinti, F., Gazzano, M., Wadgaonkar, P. P., Priimagi, A., Camaioni, N., & Vivo, P. (2017, 2017/04/12). Crystallisation-enhanced bulk hole mobility in phenothiazine-based organic semiconductors. *Scientific Reports*, 7(1), 46268. <https://doi.org/10.1038/srep46268>