

三氯酚與環糊精之結合常數研究

薛仲娟

國立宜蘭技術學院化學工程學系副教授

摘要

以紫外光光譜法決定 5 種三氯酚(2,3,4-、2,3,5-、2,3,6-、2,4,5-及 2,4,6-三氯酚)之結構異構物與 β -環糊精形成內包錯合物之結合常數 K_f 。三氯酚與 β -環糊精作用除了依三氯酚的形狀大小與 β -環糊精孔洞適合性及疏水性作用力外，二者之間尚有氫鍵作用力，是以此五種三氯酚與 β -環糊精有不同程度的結合力。當 β -環糊精濃度增加時，其中 2,3,5-及 2,4,6-三氯酚與 β -環糊精形成內包錯合物之 λ_{\max} 為紅位移(red shift)，其餘三種三氯酚(2,3,4-、2,3,6-及 2,4,5-)呈藍位移(blue shift)，且此五種三氯酚之內包錯合物在 λ_{\max} 吸收度皆呈 hyperchromic。三氯酚為有機酸，在高 pH 時會解離成多氯酚陰離子，所以不同 pH 時，三氯酚若為中性分子時與 β -環糊精之 K_f ，比為陰離子時大。若三氯酚上之羥基若被氯阻擋者，其 K_f 較小如 2,3,6-及 2,4,6-三氯酚者，三氯酚之 K_f 最大為 2,4,5-三氯酚者。

關鍵詞：紫外光光譜法、三氯酚、 β -環糊精、結合常數

Determination of Formation Constants for β -Cyclodextrin Complexes of Trichlorophenols

Chung-Chuan Hsueh

Associate professor, Department of Chemical Engineering, National I-lan Institute of Technology

Abstract

The formation constants of five trichlorophenols (2,3,4-、2,3,5-、2,3,6-、2,4,5-及 2,4,6-trichlorophenol) β -cyclodextrin(β -CD) complexes were determined by ultraviolet-visible (UV-VIS) spectroscopic method. Three chloro substituents of these trichlorophenols were different displacements on phenol, their structure would influence the interaction and the formation constants of inclusion complexes between trichlorophenols and β -CD. The interactions of inclusion complexes were included hydrophobic interaction and hydrogen bonding. The λ_{\max} of inclusion complexes of 2,3,5- and 2,4,6-trichlorophenol with β -CD were red shift, the other were blue shift. Nevertheless, the absorbance of the five trichlorophenols at λ_{\max} were all hyperchromic, as β -CD concentration were increased. If the weak acid trichlorophenols were anion, the formation constants of their inclusion complexes were less than the neutral forms'. If the hydroxy of trichlorophenol were more hindered, the formation constants of their inclusion complexes were less. The formation constant of 2,4,5-trichlorophenol were maximum in all.

Key Words: trichlorophenol, β -cyclodextrin, formation constant, ultraviolet-visible (UV-VIS) spectroscopic method

一、 前言

氯酚常作為殺菌劑、殺蟲劑或為其他殺蟲劑之前驅物，或經由樹脂、塑膠、染料及醫藥之工業製程的工業廢水釋出排放至環境，具有惡臭影響水質，亦會抑制微生物對流出物之處理活性，恐其具有生物累積性。較高氯酚如五氯酚及 2,3,4,6-四氯酚，先前在木材業常當防霉劑。另外一些氯酚為目前農業使用之 chlorophenoxy 除草劑的降解物等。氯酚的大量使用已經導致地球及水中生態污染，造成氯酚類為主要污染物之一。美國環保署 (U.S.A EPA) 於一九七九年公佈了十一種主要的酚類污染物，其中氯酚類即有 2-氯酚 (2-chlorophenol; 2-CP); 2,4-二氯酚 (2,4-dichlorophenol; 2,4-DCP)、4-氯-3-甲基酚 (4-chloro-3-methylphenol; 4-C-3-MP)、2,4,6-三氯酚 (2,4,6-trichlorophenol; 2,4,6-TCP) 及五氯酚 (pentachlorophenol) 等五種。在河流、泥巴及都市廢水流出物及淤泥中已被偵測到氯酚，以及在水相生態發現毒物效應。一些氯酚已經在水中食物鏈出現累積性，但五氯酚在人體內沒有如 DDT 或 DDE 生物累積性程度[1]。通常在河流及其他水樣發現它們在低濃度(通常 75 ug/l 或低於此)，而例行消毒的飲用水氯化會增加酚的氯化。這些副產物會導致臭味及影響口感之潛在性，及降低相關母體酚類之微生物分解性[2]。

氯酚在環境上為重要污染物，因為其高毒性及生物累積性的趨勢。因此需要測量與監控技術，以確認污染程度；鑑定在公共衛生及環境上污染效應；對於所選擇適當改善方法提供資料。另外對於研究人類及動物暴露在生化樣品的分析上測量氯酚也是亟需。目前對氯酚已經發展在許多不同基質偵測方法，其中大多為層析技術，如紙層析及薄層層析，目前主要為 LC 及 GC，以 SFC 分離酚也有報導，最近應用電泳方法，如電動微胞層析(MECC)及毛細管區帶電泳法(CZE)已經被報導[3]。

環糊精在分離結構異構物的能力已經被用在分析應用上若干年。這些環狀寡糖，大部分含有 6-8 連結葡萄糖單位 (α-, β-, γ-環糊精(CD)) 圓錐孔洞的模式，具有疏水性內部及親水性邊緣(一級及二級羥基)(圖. 1)[4]。有機分子進入環狀寡糖(環糊精)的內包性已經廣泛探討為酵素觸媒模式。其普及性即因形成內包錯合物現象提供許多優點，包括反應立體特一性及過度狀態的穩定化。環糊精內層為相當疏水性，因為 C-H 群的環及糖類的氧，其在邊圍羥基提供分子親水性。這種特殊組態提供客分子為內包錯合物之適當介質。溶質與環糊精形成錯合物時的作用力，主要有氫鍵、凡得瓦(Van der Waals)作用力或疏水性作用[5]。溶質的大小、形狀或官能基均會影響與環糊精之作用力，因為溶質與環糊精不同的作用力而有不同的結合常數。對於分離結構異構物在層析法或在毛細管電泳法中常在動相中添加環糊精(CD)。再且葡萄糖有 5 個對掌中心能與對掌異構物形成不同主客錯合物 (host-guest complexes)，對於對掌異構物分離具高度選擇性，所以添加環糊精對於分離對掌異構物和位置異構物的分離能提供很好的選擇性[6]。

研究環糊精之分離機制，在學理上為與分離物形成環糊精內包錯合物為基礎，及藉由不同儀器方法偵測求證 [5,7]。決定溶質與環糊精之結合常數常用的方法有 electron-spin resonance(ESR)光譜法、氫質子荷磁共振光譜法(proton nuclear magnetic resonance-¹H-NMR)、紫外光-可見光光譜法(ultraviolet-visible)、螢光光譜法(fluorescence)、circular dichroism(CD)光譜法、optical rotatory dispersion (ORD)、近紅外光(near-IR)、紅外光(infrared)或拉曼(Raman)光譜法、X-ray 光譜法、potentiometry、positron annihilation、thermoanalytical 法 polarograph、microcalorimetry 法、層析法 (chromatography)和毛細管電泳法(CE)等方法，另外也有以 Molecular mechanics(MM)或 AM1 或 Molecular dynamics calculation 等分子理論計算法求得。

本實驗目的是研究三氯酚與環糊精形成內包錯合物，利用客分子與環糊精鍵結在 UV-VIS 範圍之光電性質上的差異性，估算三氯酚與環糊精之結合常數，研究其結構上差異與不同結合作用力因素影響結合常數。並可將此結合常數應用於環糊精在層析方法上分離三氯酚。

二、 藥品及實驗方法

1. 藥品：

-CDM.W1135.01，分子式 $C_{42}H_{70}O_{35} \cdot XH_2O$ 購自 ACROS ORGANICS，New Jersey U.S.A 藥廠。酸性緩衝溶液使用磷酸 (phosphoric acid) H_3PO_4 ，鹼性緩衝溶液使用磷酸鈉 (Sodium phosphate) Na_3PO_4 。三氯酚分別購自日本 TCI 公司、美國 Aldrich 公司、德國 Riedel-de Haen 公司。

2. 設備：

本實驗機型使用 HITACHI UV2010，使用軟體 UV Solution

3. 步驟：

本次實驗使用鹼酸性兩種溶液，分別是 0.06 M 的磷酸以及磷酸鈉的溶液；-CD 用緩衝溶液配成 10 mM 溶液，再以緩衝溶液稀釋成不同濃度 1~7mM 的溶液。將五種不同結構之(2,4,6-、2,3,6-、2,3,5-、2,4,5-、2,3,4-)三氯酚以

10 ml 甲醇稀釋，配製成 1000 ppm，再以甲醇稀釋配製成為待測 Sample。UV 設定偵測波常範圍為 190-400 nm；完成五種不同結構之(2,4,6-、2,3,6-、2,3,5-、2,4,5-、2,3,4-)-三氯酚 Sample 溶於酸、鹼溶液所配製的 1~7 mM β -CD 溶液和空白實驗之吸收度的測量。

三、 結果與討論

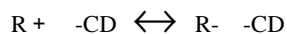
在低 pH 時，即 0.060 M 磷酸緩衝溶液中，圖 2~6 分別是五種三氯酚 (2,4,6-、2,4,5-、2,3,4-、2,3,5-、2,3,6-) 在不同濃度之 β -CD 溶液中時 UV 圖譜。此五種三氯酚之 λ_{max} 波長約在 205nm (E_2 帶)，隨著 β -CD 濃度的增加，其中 2,3,5- 及 2,4,6- 三氯酚與環糊精形成內包錯合物之 λ_{max} 為紅位移(bathochromic or red shift)，其餘三種 (2,3,4-、2,3,6- 及 2,4,5-) 三氯酚呈藍位移(hypsochromic or blue shift)，且所有三氯酚之內包錯合物在 λ_{max} 之吸收度皆增強即呈 hyperchromic。

因為三氯酚是有機酸，在高 pH 即 0.060 M 磷酸三鈉時會解離成三氯酚陰離子，圖 7 是 2,3,4- 三氯酚在高 pH 時不同濃度之 β -CD 溶液中時 UV 圖譜，此時之 λ_{max} 波長移至約 220nm。隨著 β -CD 濃度的增加，此五種三氯酚陰離子之 λ_{max} 波長發生輕微紅位移現象 (bathochromic or red shift)，吸收度則隨著 β -CD 濃度增加而先降後升 (Hypochromic absorption)。

各三氯酚或各三氯酚陰離子與環糊精作用除了依其分子大小與環糊精孔洞之適合性及疏水性作用力外，二者與環糊精之間尚有氫鍵作用力。此五種三氯酚和其三氯酚陰離子與 β -CD 作用有明顯差異，以致在 λ_{max} 處位移及吸收度變化趨勢不同。三氯酚若進入 β -CD 的非極性孔洞環境產生較強疏水性作用力，造成 λ_{max} 躍遷部分會有所謂的藍位移現象(hypsochromic or blue shift)如 2,3,4-、2,3,6- 及 2,4,5- 三氯酚；而 red shift 部分如 2,3,5-、2,4,6- 三氯酚則因其進入 β -CD 的孔洞較淺，是以與水溶液及 β -CD 的外圍 hydroxy 有較強極性作用所致。再者三氯酚陰離子之內包錯合物是輕微的紅位移，也是因三氯酚陰離子與 β -CD 有極性作用所致。另外，吸收度之不同是不同濃度或形成內包錯合物所致。因三氯酚與 β -CD 之內包錯合物之莫耳吸收係數大於三氯酚之莫耳吸收係數，是以當 β -CD 濃度增加時其吸收度亦隨之增加；而三氯酚陰離子與 β -CD 之內包錯合物之莫耳吸收係數小於三氯酚陰離子之莫耳吸收係數，所以其吸收度則隨 β -CD 濃度先降後升。此因三氯酚與 β -CD 之氫鍵作用，使三氯酚之助色團效應增強，而三氯酚陰離子與 β -CD 之氫鍵作用則是減弱助色團效應[8~10]。

研究三氯酚與環糊精形成內包錯合物之結合常數，利用客分子與環糊精鍵結時在 UV-VIS 範圍之光電性質上的差異性，利用 Scott's eq 估算三氯酚與環糊精之結合常數[10]。

假設三氯酚與 β -CD 以 1 : 1 化學計量形成內包錯合物之平衡式及結合常數 (K_f) 定義如下



$$K_f = \frac{[R\text{-}\beta\text{-CD}]}{[R] \cdot [\beta\text{-CD}]}$$

R 及 β -CD 分別代表三氯酚及 β -環糊精，則

$$[R]_t = [R] + [R\text{-}\beta\text{-CD}]$$

$$[\beta\text{-CD}]_t = [\beta\text{-CD}] + [R\text{-}\beta\text{-CD}]$$

$[R]_t$ 及 $[\beta\text{-CD}]_t$ 分別代表三氯酚及 β -CD 溶液總濃度。

內包錯合物結合常數 K_f 值可由 Scott's eq 求得

$$\frac{a \cdot c}{d} = \frac{1}{K_f \cdot e_c} + \frac{c}{e_c}$$

a 是為三氯酚濃度，c 是為 β -CD 濃度，設 $a < c$ ， e_c 是為空白與含三氯酚 β -CD 溶液濃度莫耳吸收率差，d 是為未加 β -CD 與加入 β -CD 後之三氯酚吸收度差。

使 $a \cdot c / d$ 對 c 作圖在波長 200nm 左右有良好的線性關係，詳見圖 8。由上列數據處理結果見表一發現 2,4,5- 三氯酚之結合常數最大值為 2570，此因 2,4,5- 三氯酚之結構較具線型，是以較易進入 β -CD 孔洞內，有較強疏水性作用，甚而酚基與 β -CD 之羥基有氫鍵作用；反之，2,4,6- 三氯酚結構較不易進入 β -CD 孔洞中，而且氯的阻擋效應減弱氫鍵作用，是以 2,4,6- 三氯酚之 K_f 值最小為 970。而 2,3,5- 三氯酚之取代基位置雖與 2,4,6- 三氯酚相似，但其羥基未被氯的阻擋，所以其結合常數略大於 2,4,6- 三氯酚。再者 2,3,6- 與 2,3,4- 三氯酚兩者結構上相類似，因此，進入孔洞時與 β -CD 作用強度相差無幾，是以結合常數也相同。本實驗以分子吸收光譜法求出三氯酚結構異構物與 β -CD

之結合常數，與在薛之博士論文中[11]以毛細電泳法研究三氯酚與 β -CD 之 K_f 值之比較見表一，均是 2,4,5-三氯酚之 K_f 最大，以此二法求得之結合常數除了 2,4,5-三氯酚結合常數值差異較大，其他三氯酚者則很相近，且大小順序一致，即表示此二法研究此五種三氯酚與 β -CD 作用強弱是一致。

由所得之結合常數，可以應用於判定是否適用添加 β -CD 於高效能液相層析儀 (HPLC) 或毛細管電泳法之達成分離三氯酚結構異構物之可行性。例如由下列有關於毛細管電泳法之公式可知，三氯酚結構異構物之 μ_{eff} (電泳遷移率) 與結合常數之關係如下[11]：

$$\mu_{eff} = \frac{m_{A^-} + K_{A^-CD} \times [CD] \times m_{A^-CD}}{1 + K_{A^-CD} \times [CD] + \frac{[H_3O^+]}{K_a} \times (1 + K_{HACD} \times [CD])}$$

其中 μ_{A^-} 、 μ_{CD} 與 K_a 、 K_{A^-CD} 和 K_{HACD} 分別是弱酸分析物之極限電泳遷移率、解離常數、與結合常數，而 μ_{eff} 是為電泳遷移率， $[H_3O^+]$ 與 $[CD]$ 可為實驗變數。利用本次實驗中所求得之結合常數代入上式中，即可求得 μ_{eff} ，判定分析物(三氯酚)與 β -CD 於毛細管電泳法中之最佳分離條件。

另外，在 HPLC 方面，則是利用下列式子[12]：

$$\frac{1}{k'} = \frac{1}{k'_0} + \frac{K_f [CD]_T}{k'_0}$$

k' - 是為 capacity factor

$k'_0 = K_0 \times \phi$ ， K_0 是為分佈常數， ϕ 是為管中靜動態相比比例；是為未添加 β -CD 之 capacity factor， $[CD]_T$ - 加入動相 $[CD]$ 濃度， K_f - 結合常數。若將以已知之 K_f 值代入式子，求出 k' 值；藉由 k' 值求得便可估計三氯酚在 β -CD 溶液動相中的分離效果。

雖然有多種方法可估算三氯酚與 β -CD 之結合常數，而其中紫外光-可見光光譜法為簡單操作，且可提供層析方法進行分離時參考，再者，亦無以層析方法須分離及確認之繁瑣操作，才能估算三氯酚與 β -CD 之結合常數。

四、結論

本實驗藉由分子吸收光譜法求出三氯酚結構異構物與 β -CD 之 K_f 值，研究其結構上差異與不同結合作用力因素影響結合常數。三氯酚異構物與 β -CD 的作用，首要的是溶質的分子形狀是否適合 β -CD 的孔洞大小，其次是主客體間之凡得瓦作用力強弱和與環糊精之羥基間之氫鍵作用力大小。

五、參考文獻

1. Buisson, R.S.K., et al.,(1984), "Determination of Chlorinated Phenols in Water, Wastewater, and Wastewater Sludge by Capillary GC/ECD", *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 22, 339-342.
2. Coutts, R.T., et al.,(1979), "Gas Chromatographic analysis of trace phenols by direct acetylation in aqueous solution", *Journal of Chromatography*, 179, 291-299.
3. Pruas, P., et al., (1993), "Separation of chlorophenols by capillary isotachopheresis", *Analytica Chimica Acta*, 277, 97-101.
4. Pruas, P., et al., (1993), " β -cyclodextrin in the capillary isotachopheretic separation of chlorophenols ", *Analytica Chimica Acta*, 281, 397-400.
5. Politi, M.J., et al., (1995), "Near-Infrared Spectroscopic Investigation of Inclusion Complexes Between Cyclodextrins and Aromatic Compounds", *J. Phys. Chem.*, 99, 14137-14141.
6. Novotny, (1992), "Chiral separations of basic drugs and quantitation of bupivacaine enantiomers in serum by capillary electrophoresis with modified cyclodextrin buffers", *Journal of Chromatography*, 608, 265-274.
7. Song Li and Purdy, W.C., (1992), "Circular Dichroism, Ultraviolet, and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Studies of the Chiral Recognition Mechanism of β -cyclodextrin", *Anal. Chem.*, 64, 1405-1412.
8. 王應瓊，儀器分析，中央出版社。

- 9.Skoog, D.A., Leary, J. J., (1992),Instrumental Analysis, 4th ed., p153.
- 10.Divakar, S., Maheswaran, M.M., (1997),”Structural Studies on Inclusion Compounds of ***β***-cyclodextrin with Some Substituted Phenols”, J. of Inclusion Phenomena and molecular Recognition in Chemistry 27:113-126.
- 11.薛仲娟博士論文 , 1999.
- 12.Letellier, S., et al, (1995),”Determination of the formation constant for the inclusion complex between rutin and methyl-***β***-cyclodextrin”, .Analytica Chimica Acta, 315 357-363.

91 年 09 月 19 日投稿

91 年 10 月 2 日接受

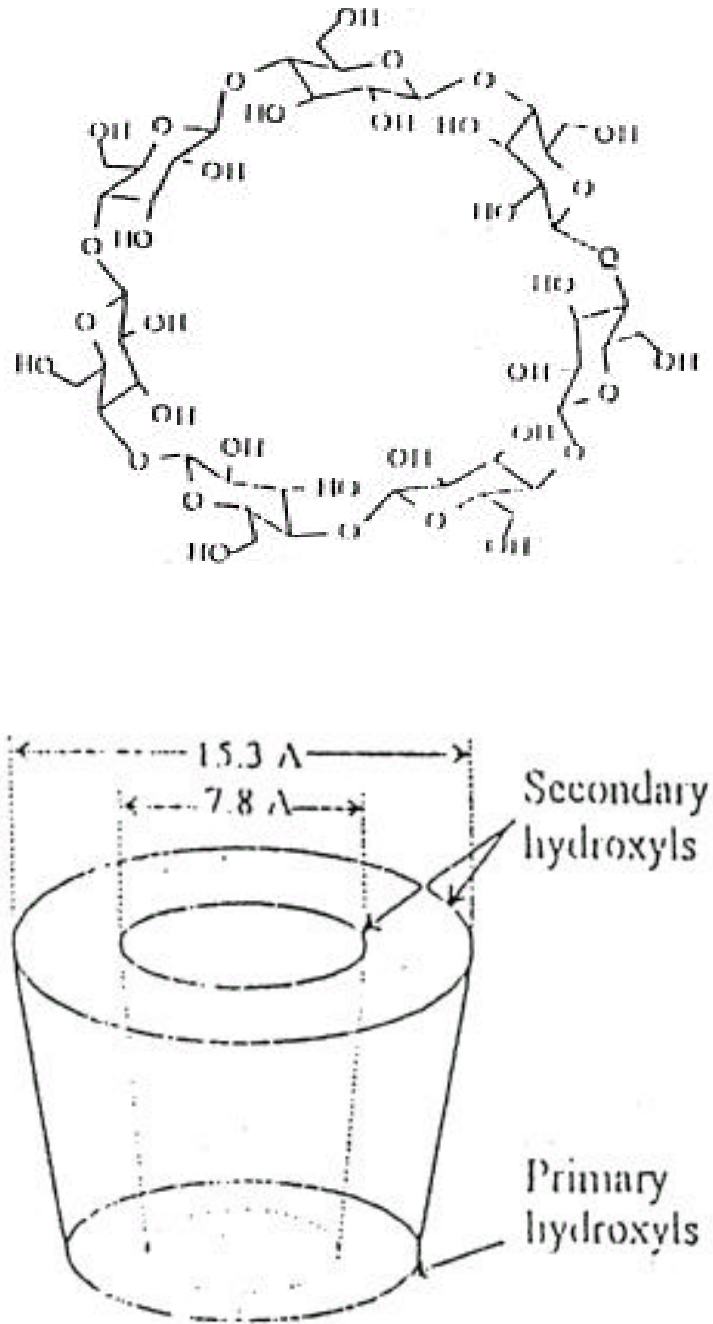


圖. 1 α -環糊精的結構

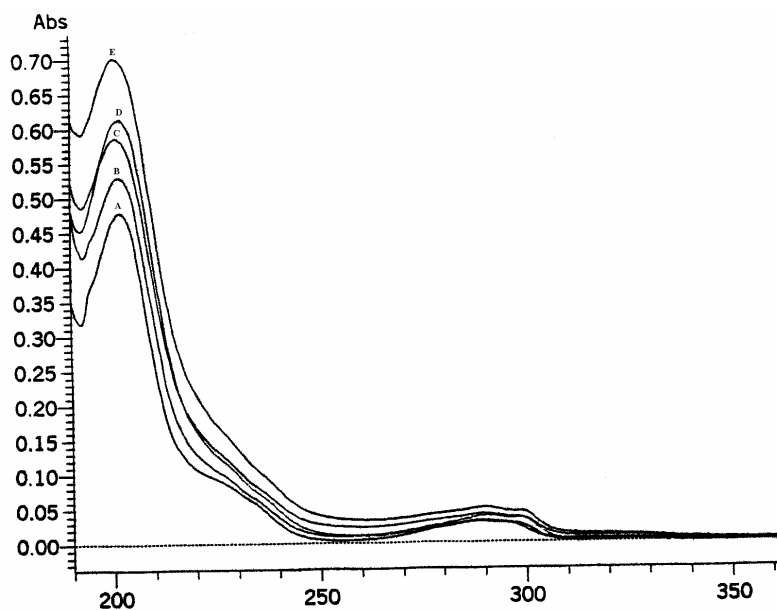


圖 2：2,4,5-三氯酚在磷酸溶液中，加入不同濃度之 β -CD 時之 UV 光譜圖。

A:環糊精濃度為 0. B:環糊精濃度為 0.625 mM. C: 環糊精濃度為 1.25 mM. D:環糊精濃度為 2.5 mM. E: 環糊精濃度為 5.0 mM.

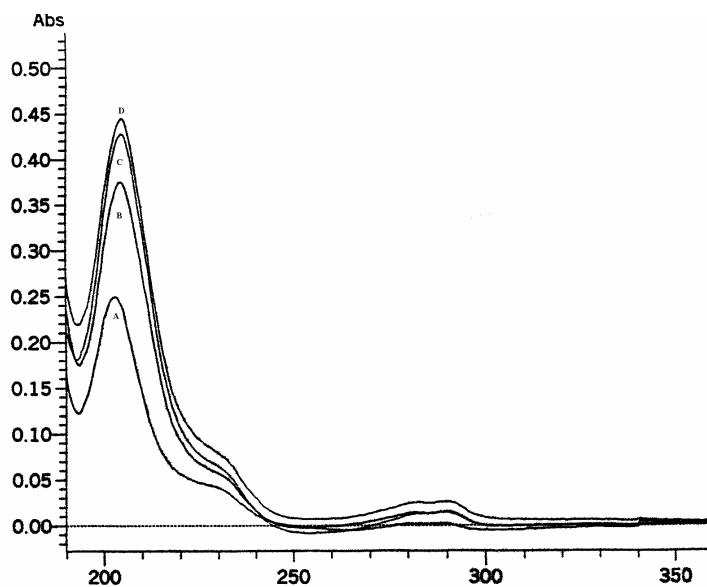


圖 3：2,3,5-三氯酚在磷酸溶液中，加入不同濃度之 β -CD 時之 UV 光譜圖。

A:環糊精濃度為 0. B:環糊精濃度為 3 mM. C: 環糊精濃度為 5 mM. D: 環糊精濃度為 7 mM.

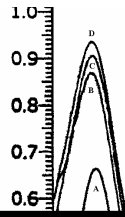


圖 4：2,3,4-三氯酚在磷酸溶液中，加入不同濃度之 β -CD 時之 UV 光譜圖。

A:環糊精濃度為 0. B:環糊精濃度為 3 mM. C:環糊精濃度為 5 mM. D. 環糊精濃度為 7 mM.

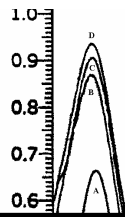


圖 5：2,3,6-三氯酚在磷酸溶液中，加入不同濃度之 β -CD 時之 UV 光譜圖。

A:環糊精濃度為 0. B:環糊精濃度為 1 mM. C:環糊精濃度為 4 mM. D. 環糊精濃度為 7 mM.

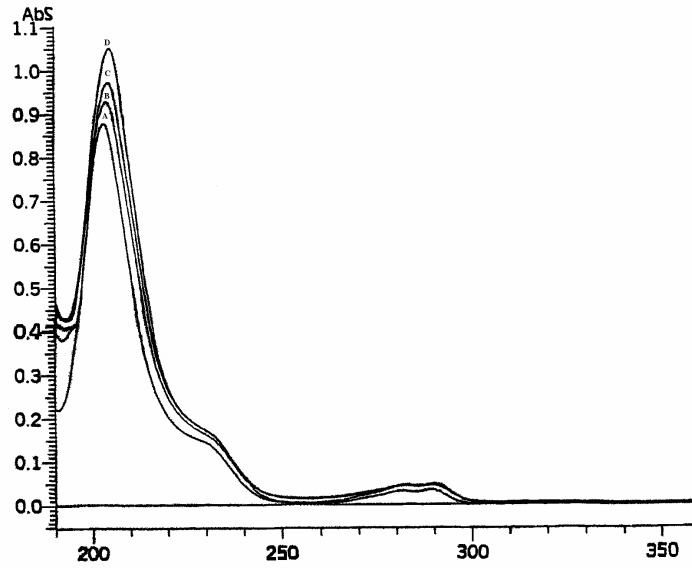


圖 6：2,4,6-三氯酚在磷酸溶液中，加入不同濃度之 β CD 時之 UV 光譜圖。

A.環糊精濃度為 0. B.環糊精濃度為 1 mM. C.環糊精濃度為 2 mM. D. 環糊精濃度為 3 mM.

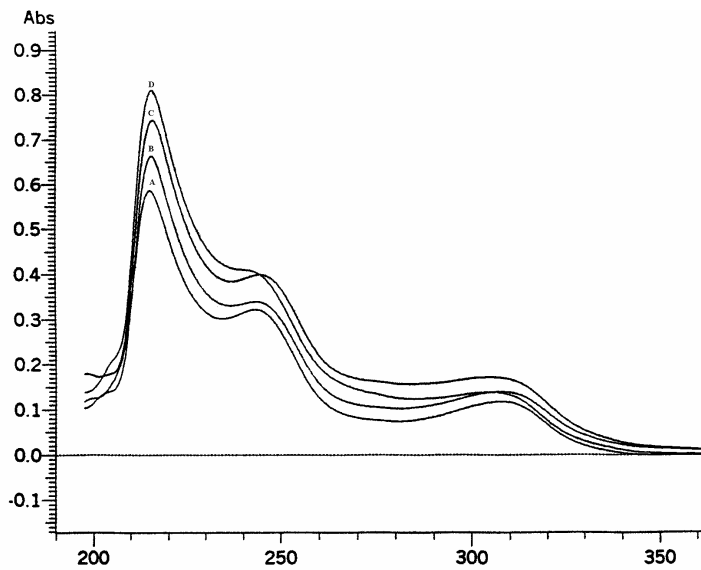


圖 7：2,3,4-三氯酚在磷酸鈉溶液中，加入不同濃度之 β CD 時之 UV 光譜圖。

A.環糊精濃度為 5. B.環糊精濃度為 2.5 mM. C.環糊精濃度為 0.625 mM. D.環糊精濃度為 0 mM.

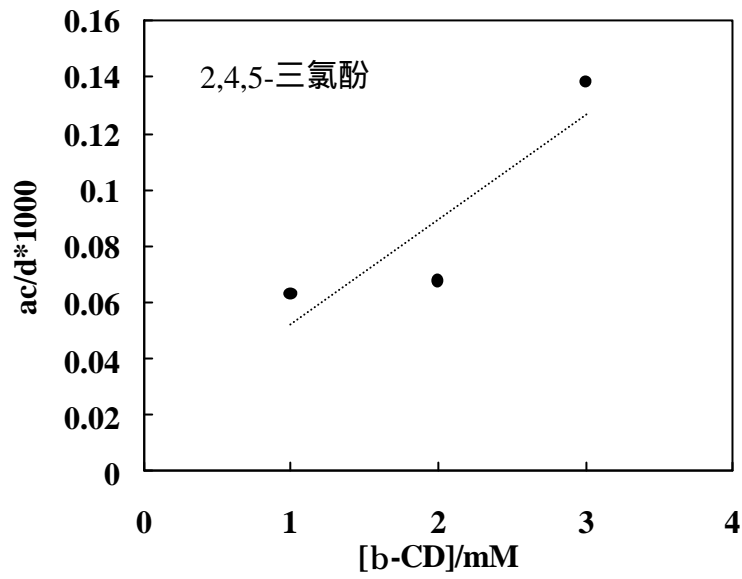


圖 8：在磷酸溶液中，2,4,5-三氯酚之 UV 吸收度對 β -CD 濃度作圖。

表 1 各三氯酚在酸性時與 β -環糊精之結合常數

| 三氯酚 | 斜率 | 截距 | K_f / $*K_f$ | R^2 |
|-------|--------|--------|----------------|--------|
| 2,4,6 | 1.0725 | 1.1051 | 970/900 | 0.78 |
| 2,4,5 | 0.374 | 0.1453 | 2570/5000 | 0.7982 |
| 2,3,4 | 0.4103 | 0.3923 | 1050/1100 | 0.9356 |
| 2,3,5 | 0.6094 | 0.5624 | 1080/1400 | 0.8984 |
| 2,3,6 | 1.0218 | 0.9776 | 1050/1100 | 0.9423 |

* K_f 摘自 [11] 取平均值。