

出國報告（出國類別：實習）

赴日本京都工藝纖維大學生質材料科學系，研習環狀低聚乳酸(cyclic oligo(lactic acid))製備技術

服務機關：核能研究所

姓名職稱：王大明 研究助理

派赴國家：日本

出國期間：103年7月13日~103年8月24日

報告日期：103年8月28日



## 摘要

本次實習目的主要赴日本京都工藝纖維大學生質材料科學系小原仁實 (Prof. Hitomi Ohara) 教授實驗室，研習環狀低聚乳酸製備技術。其中，實習內容包含環狀低聚乳酸合成、萃取分離並利用 MALDI-TOF 質譜等方式分析取得環狀低聚乳酸相關資訊。其合成及分析方法與聚乳酸等高分子聚合物極為相似，期使所學之相關合成分析技術能拓展至乳酸後端合成應用，對後續發展高值化生質化學品應用開發方向規劃，可作相關技術研發背景知識之借鏡。最後彙整出相關心得和建議事項，包含乳酸純化經驗分享、環狀低聚乳酸研究概況觀察、以及實習期間之所見所聞等，供所內長官及同仁參考。

# 目 次

(頁碼)

摘 要	i
一、目 的	1
二、過 程	1
三、心 得	21
四、建 議 事 項	22
五、附 錄	23

附錄一、線性及環狀低聚乳酸質量理論計算值表

附錄二、參考文獻

# 一、目的

生質精煉技術係化學組後續重點研究方向之一，然目前多偏重於生化製程及有機產品之分離純化開發，生質物後端應用產品之合成研發投入則相對有限，故應為未來深具潛力的發展方向。因此，本次出國公差遂赴日本京都工藝纖維大學生質材料科學系小原仁實(Prof. Hitomi Ohara)教授實驗室研習環狀低聚乳酸製備技術，並期待建立未來良好之合作關係。小原仁實教授過去曾在日本著名之島津製作所進行乳酸合成基礎實驗，並擔任過年產 100 噸生質材料工廠建設專案領導人，亦在 TOYOTA 汽車擔任過年產 1000 噸建設工廠專案領導人，為一具日本業界實務生產經驗學者，在乳酸純化、聚乳酸合成及生產等領域有豐富及獨特的研發及實務經驗。

本次出國實習目的為研習環狀低聚乳酸製備技術。一般乳酸聚合形成聚乳酸時多為線性聚合物，而環狀低聚乳酸通常被視為聚合過程中產生之副產物。然而，近年亦有環狀聚合物相關文獻發表，包含環狀低聚乳酸合成、分析鑑定等，亦有文獻指出環狀低聚乳酸具有抑制 pyruvate kinase 及 lactic dehydrogenase 等部分酵素的功效，利用此種特性可做為發展抑制 FM3A 腹水腫瘤細胞之藥物潛在應用方向。實習內容包含環狀低聚乳酸合成、萃取分離並利用 MALDI-TOF 質譜等方式分析取得環狀低聚乳酸相關結構鑑定資訊。其合成及分析方法與聚乳酸等高分子聚合物極為相似，期使所學之相關合成分析技術能拓展至乳酸後端合成應用，對後續發展高值化生質化學品應用開發方向規劃，可作相關技術研發背景知識之借鏡。

# 二、過程

## (一) 過程說明

本次實習行程摘要如下表一：

表一 行程摘要表

日期	地點	活動內容
7/13 (日)	台北-關西機場-京都	由台灣桃園機場搭乘長榮航空班機(BR 132 班次)抵達日本關西機場後，再搭乘關空特急 Haruka 抵達京都，並至京都工藝纖維大學生質材料科學系小原仁實教授實驗室報到。
7/14-8/23 (一-六)	京都	在京都工藝纖維大學生質材料科學系小原仁實教授實驗室，進行實習工作。
8/24 (日)	京都-關西機場-台北	從京都出發，搭乘關空特急 Haruka 抵達日本關西國際機場後，再搭乘長榮航空班機(BR 129 班次)返回台灣

### 1. 103年7月13日：

由桃園出發，搭乘長榮航空(BR 132 班次)8:30 離開台灣桃園國際機場(TPE)，當日直飛，

中午12:10 抵日本關西國際機場(Kansai Airport)，再搭乘關空特急(Haruka)抵達京都，由小原教授實驗室博士班學生野村圭一郎(Keiichiro Nomura)與碩士班學生新村龍吾(Ryugo Shinmura)接送前往校園，並與小原仁實教授會面，了解四周環境，當日由博士生野村圭一郎簡報實驗內容，雙方討論整體研究規劃，並至松ヶ崎學生館(College House Matsugasaki)報到、住宿。

## 2. 103年7月14日-8月23日：

由碩士生新村龍吾帶領認識系館環境，並即刻展開與新村龍吾、野村圭一郎等相關同仁進行各類項目討論與實習實驗。實習內容包含環狀低聚乳酸的合成、萃取取得環狀低聚乳酸產物、利用MALDI-TOF、ESI等質譜分析鑑定聚合產物分子量分佈，並參與實驗室團隊工作討論會議等，期間利用聚合條件的改變，成功增加了環狀低聚乳酸的產率，從中獲得不少相關方面知識。

## 3. 103年8月24日：

從京都出發，搭乘關空特急Haruka抵達日本關西國際機場後，下午18:35搭乘長榮航空(BR 129 班次)平安返回台灣的家。

## (二) 實習單位簡介

京都工藝纖維大學，最早的起源為京都蠶業講習所，於 1899 年成立，1949 年合併京都高等工藝學校(Kyoto College of Technology，成立於 1902 年)及京都高等蠶絲學校(Kyoto College of Textile Fibers，成立於 1899 年)成立京都工藝纖維大學，2004 年根據國立大學法人法，改制為國立大學法人。現今京都工藝纖維大學有物質及生命科學(包含應用生物學系、生物分子工程學系、高分子科學與工程學系、化學與材料工程學系、生質材料科學系)、工程設計(包含電子、情報科學、機械系統工程、工程設計及管理學系)、設計(包含建築學、設計等學系)、基礎科學等領域，主校園位置在京都市左京區，地鐵烏丸線松ヶ崎站(Matsugasaki)旁邊，如下圖一所示：



圖一 京都工藝纖維大學交通位置圖

本次實習單位小原仁實教授(Prof. Hitomi Ohara)，於 1994 年在大阪大學及 2006 年在九州大學取得工學及農學博士，曾於 1984 年至 2002 年在島津製作所從事乳酸合成基礎實驗，並擔任年產 100 噸生質材料的工廠建設專案領導人，2002 年至 2005 年轉職至豐田汽車，並擔任年產 1000 噸建設工廠的專案領導人，2005 年以後在京都工藝纖維大學進行生質材料相關研究，曾獲得文部科學大臣賞(研究功績賞)、日本經濟新聞社地球環境技術賞、日本生物工學會技術賞、日本化學會化學技術賞等多項獎賞，為一具實務工程經驗之研究人員。研究團隊底下有准教授麻生祐司(Associate Prof. Yuji Aso，研究領域為應用微生物及分子生物學等方面)、2 位博士班學生、13 位碩士班學生、以及 1 位大學部學生，實驗室位置在下圖二 4 號館：

### 松ヶ崎キャンパス



圖二 實習地點實驗室(紅色圈圈)在校園內之相對位置



圖三 實習地點 4 號館現場照片(左)及門口(右)

### (三) 實習內容摘要說明

#### 1. 環狀低聚乳酸相關文獻說明

一般合成生物可分解塑膠聚乳酸最常見的方法為將環狀二聚體 lactide 經由催化劑開環聚合反應生成高分子量的聚乳酸。近年來亦有將乳酸直接聚和的研究，此法具有直接且成本較低(乳酸不須經過中間物環狀二聚體 lactide 即可轉變成聚乳酸)的優勢，因此吸引不少人參與相關研究。而直接聚和乳酸會產生線性(linear)聚乳酸為主的產物，依條件不同會產生副產物環狀低聚乳酸。然而，亦有文獻指出環狀低聚乳酸可降低 FM3A 腹水腫瘤細胞中 pyruvate kinase 以及 lactic dehydrogenase 的活性，或可做為抑制 FM3A 腹水腫瘤細胞的潛力活性試劑。<sup>1</sup> 直至今日，一些文獻報導了研究環狀低聚乳酸成果，包含合成方式、分析方法、以及生化測試等。在本報告中會將相關文獻做一簡單說明。

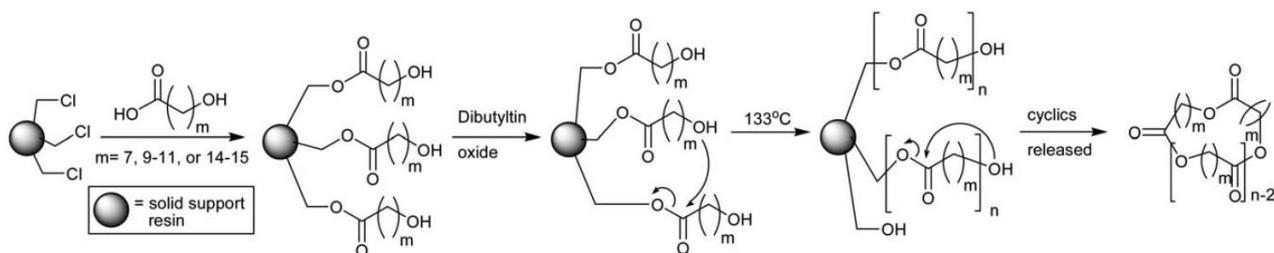
#### (1) 合成環狀低聚乳酸相關文獻

依文獻中所述，一般合成環狀聚酯類聚合物通常有下列方法：

A. 起始物 1,4-芳香環雙 COOH 官能基團衍生成為 COCl (acyl chloride)後再與 diol (HO-R'-OH)進行反應生成環狀聚合物，其合成相關技術成立了一家公司稱 Cyclic Corporation。

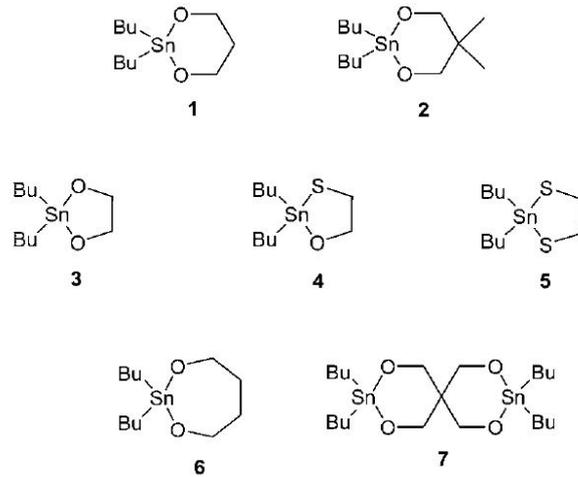
B. 起始物若為一端 COOH 另一端為 OH 基團，而欲將此起始物進行合環反應時，可以大量溶劑稀釋的方式進行，其原理是分子間環化會因濃度降低造成反應速率下降，而分子內環化則不會因濃度降低受到影響，使產物趨向生成分子內環化產物，此法為 Yamaguchi 法，但缺點為反應過程耗費大量溶劑，為一不經濟的合成方法。

C. 利用高分子等固體支撐(solid support)來控制生成環狀聚合物：以下圖四為例說明，利用高分子中外端官能基化的基團(如圖中的 Cl)與起始物中的 COOH 進行反應使 COOH 端附在高分子上，再經過聚合鍊增長(propagation)階段，最後外端 OH 再攻擊 COO-高分子斷鍵形成環狀聚合物。



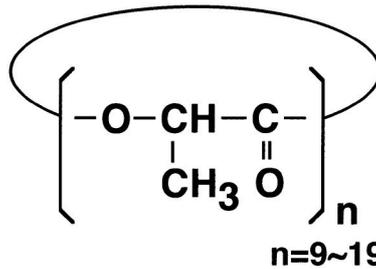
圖四 利用高分子支撐合成環狀聚合物，圖片取自參考文獻 2

D. 利用特殊催化劑如：環狀有機錫化合物(如下圖五)或是 zwitterionic N-heterocyclic carbene (在之後的合成中詳敘)進行合成。利用此法可生成高分子量的環狀聚合物，環狀有機錫化合物的缺點則是起始劑和環狀大分子化合物鍵活性較高，遇到醇類較容易分解，也不利於質譜檢測，此外有機錫起始劑為高毒性，因此無法將合成的環狀聚合物應用在生物體內等之測試。



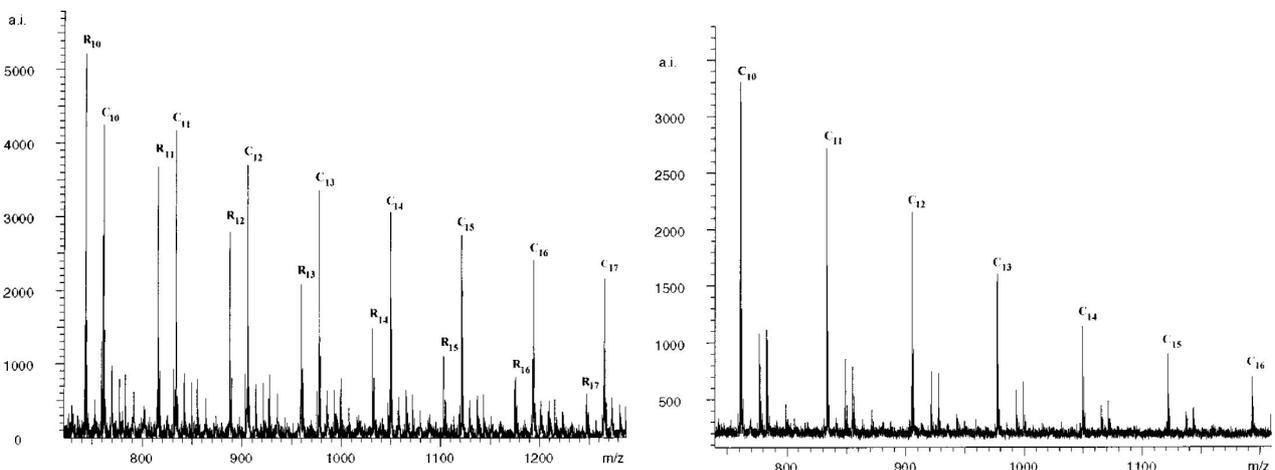
圖五 一些用作合成環狀聚合物之有機環狀錫化合物起始劑，圖片取自參考文獻 2

在 2000 年時，Aizawa 等人發表了環狀低聚乳酸對 cloned leukemic 細胞生長的影響，該文亦闡述了合成方式：利用直接聚和乳酸的方法製造，首先 90 % 乳酸先在 120 °C 常壓下進行脫水，之後再將反應加熱至 180 °C，並逐漸降壓至 5 mmHg 下進行聚合反應，產物環狀低聚乳酸聚合數目約在 9~19 之間(圖六)。<sup>3</sup>



圖六 環狀低聚乳酸化學式，聚合數目 n 在 9~19 之間，圖片取自參考文獻 3

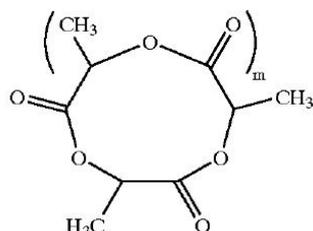
在 2001 年，Ke'ki 等人發表了在溫度 100-220 °C 範圍下進行直接聚和乳酸的研究，文中利用 MALDI-TOF 質譜分析的方式量測線性及環狀聚和產物的分布情形，發現在超過 200 °C 的溫度下，環狀聚合的產物較為增多(圖七)。文章中亦提到環狀聚和數目大小遵循 Jacobson-Stockmayer 理論。<sup>4</sup>



圖七 乳酸在 200 °C 下(左圖)及 100 °C 下進行直接聚合之 MALDI-TOF 質譜。Rx 代表 ring(環

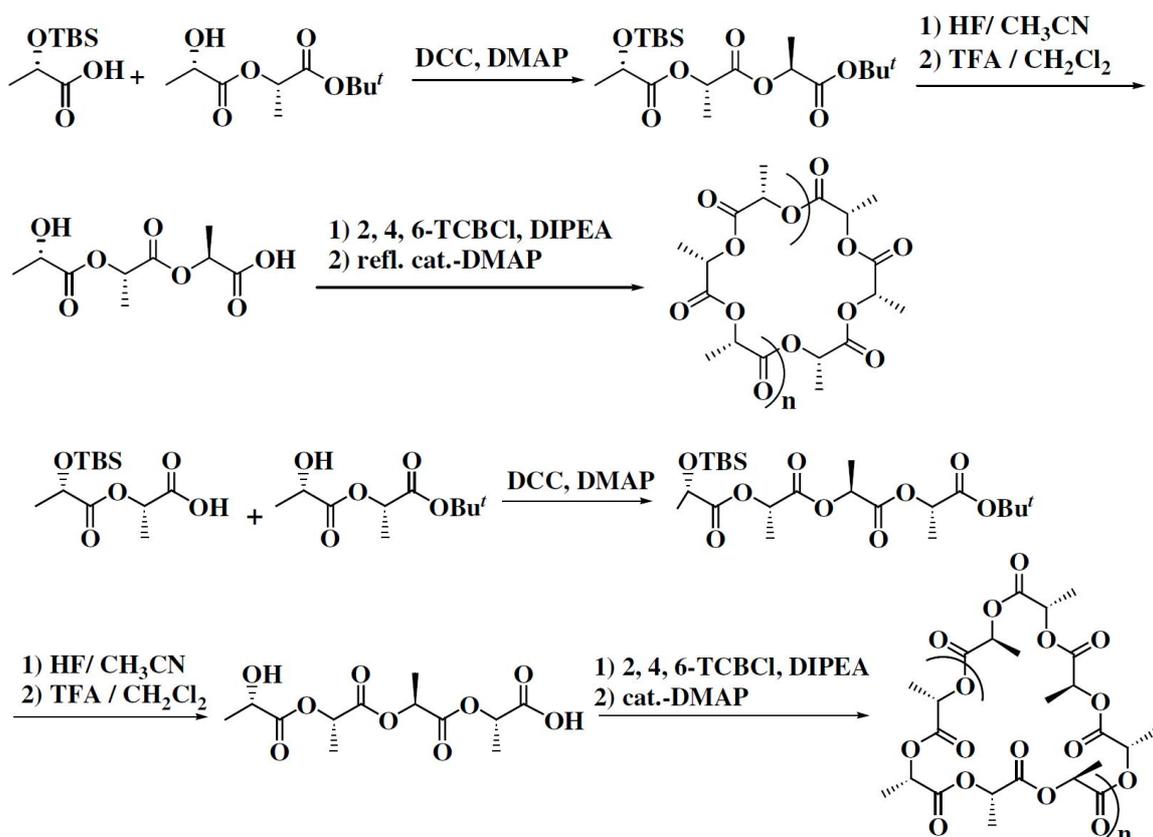
狀，cyclic)以及 Cx 表示 chain(線性，linear)低聚合物。圖片取自於參考文獻 4

在 2004-2005 年間，Watanabe 等人發表一系列環狀低聚乳酸合成專利。專利中提到的方法為利用 *n*-BuLi 以及其他鋰試劑和 *rac*-lactide 在 -80 °C 低溫下於 THF 溶液中進行聚合反應生成環狀低聚乳酸。產率約在 75-95 % 之間且聚合數目 *m* 約在 30 以下(圖八)。<sup>5</sup>



圖八 環狀低聚乳酸化學結構，其中聚合數目  $m < 30$ 。圖片取自於參考文獻 5

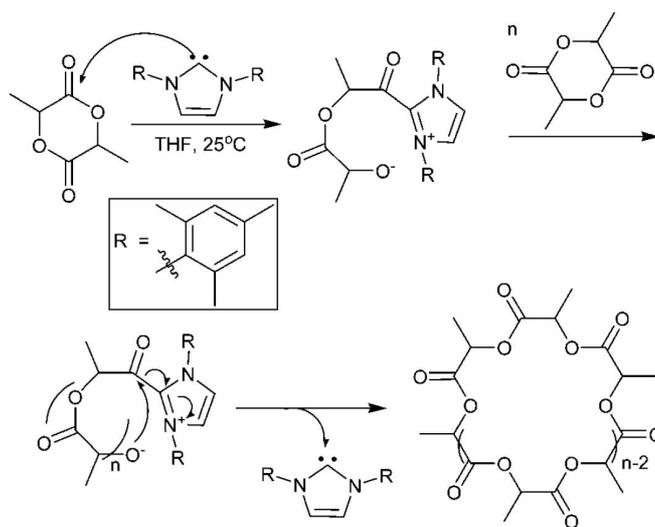
在 2006 年，Osaka 等人發表了利用 ESI 質譜分析線性(linear)、環狀(cyclic)低聚乳酸、以及它們 solvolysis 的產物。該文章中提到關於合成環狀聚乳酸的方法：先合成乳酸線性三聚體或四聚體，再以乳酸三聚體/四聚體為單體再進行環狀聚乳酸合成(合成反應式如圖九)。<sup>6</sup> 該作者在 2008 年文獻中亦提到合成乳酸環狀七聚體的合成方法：利用大量溶劑稀釋的方法(Yamaguchi 法)<sup>7</sup>將乳酸線性三聚體與線性四聚體聚合成環狀七聚體。<sup>8</sup>



圖九 合成乳酸線性三聚體/四聚體及利用線性三聚體/四聚體為單體合成環狀聚乳酸。圖片取自於參考文獻 6

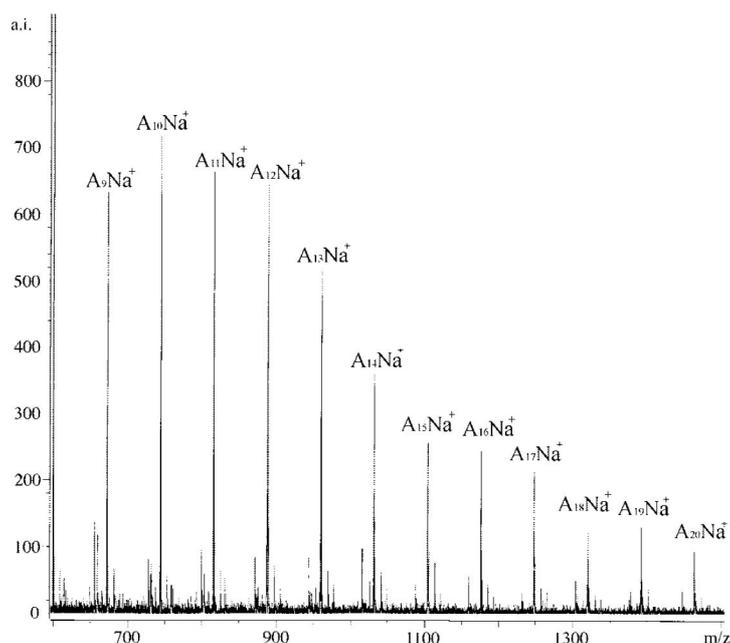
在 2005-2007 年，Csihony,<sup>9</sup> Culkin,<sup>10</sup> 以及 Jeong 等人<sup>11</sup>發展出 zwitterionic *N*-heterocyclic

carbene 催化 lactide 環擴大聚合的方法(圖十)。利用此法所聚合之產物幾乎為環狀且聚合數目超過 100，且分子量分佈約低於 1.37。此一方法亦為合成高分子量環狀聚乳酸最具效率方法。



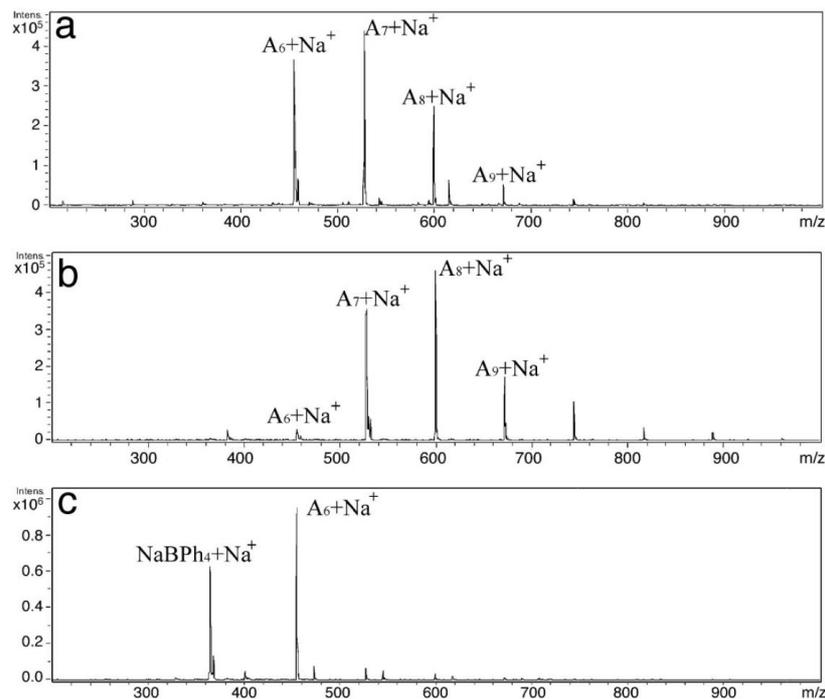
圖十 Zwitterionic *N*-heterocyclic carbene 催化環狀聚合 lactide。圖片取自於參考文獻 2

在 2006 年，Chisholm 等人發表了一種以 lactide 及 2, 5-morpholinediones 為原料合成環狀聚酯以及 cyclodepsipeptides 的方法。此法利用外面接上  $\text{NH}_2$  官能基化聚苯乙烯樹酯使用  $n\text{-BuLi}$  衍生化產製高分子支撐之催化劑  $\text{PS-C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NHLi}(\text{LiBu})_x$ ,  $x \sim 4$ 。文章中亦使用  $\text{MgMe}_2$  及  $\text{ZnEt}_2$  衍生化聚苯乙烯高分子並進行相關催化測試。在這些衍生化高分子樹酯之中，鋰鹽衍生之高分子擁有最高的活性(圖十一)。該篇文章亦使用了  $\text{NaBPh}_4$  固體和所得到之環狀低聚乳酸進行反應，證實了乳酸環狀六聚體可選擇性地被  $\text{NaBPh}_4$  所移除(圖十二)。除此之外，當  $\text{NaBPh}_4$  加入至 lactide 與鋰鹽衍生之聚苯乙烯樹酯進行反應，產物只有乳酸環狀六聚體，且轉化超過 80%。<sup>12</sup> 此一文獻結果顯示，乳酸環狀六聚體可選擇性地與  $\text{Na}^+$  結合(圖十三)且單一環狀低聚乳酸產物亦有可能合成出來。

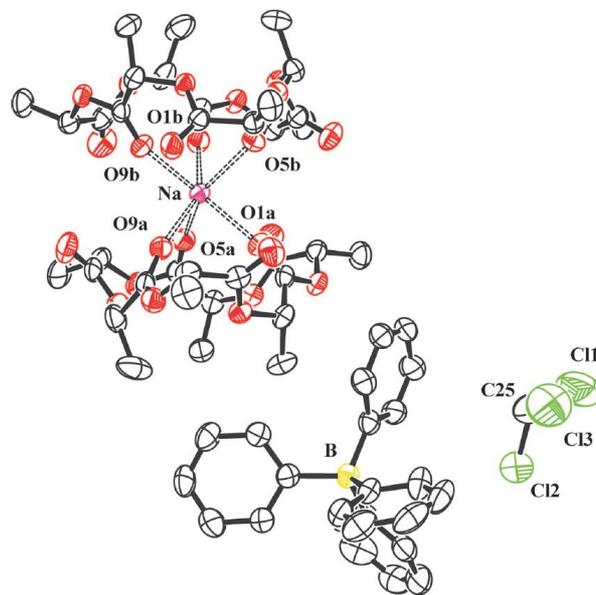


圖十一 利用  $\text{PS-C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NHLi}(\text{BuLi})_x$ , ( $x = 3.7$ ) 合成環狀低聚乳酸之 MALDI-TOF 質譜圖。A

= C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>。圖片取自參考文獻 12



圖十二 環狀低聚乳酸與 NaBPh<sub>4</sub> 反應後之 ESI MS 圖譜 (a) 反應前之環狀低聚乳酸 (b) 反應後之環狀低聚乳酸溶液 (c) 反應後之 NaBPh<sub>4</sub> 固體。圖片取自於參考文獻 12



圖十三 Na[(S,S,S,S,S)-(CH<sub>3</sub>CHC(O)O)<sub>6</sub>]<sub>2</sub>BPh<sub>4</sub> · CHCl<sub>3</sub> 的 X-ray 單晶結構，此圖並未展現出 H 原子。圖片取自參考文獻 12

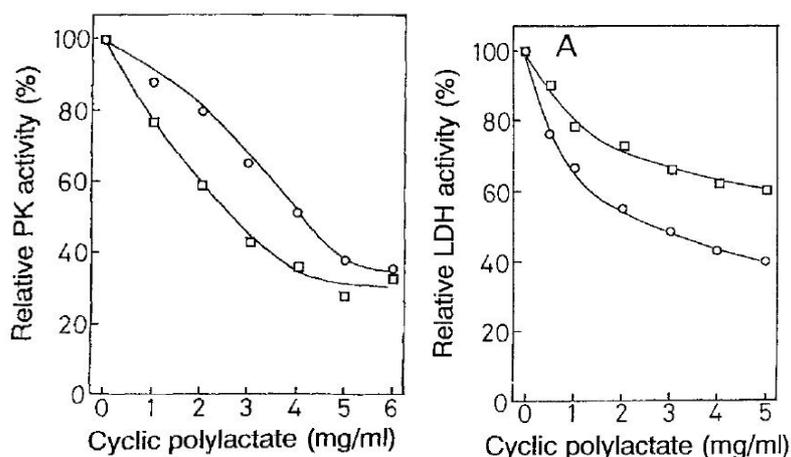
在 2007 年，Chisholm 等人又發表了可從 glycolide 和 lactide 為原料選擇性合成 18-membered ring 環狀酯類。利用 NaBPh<sub>4</sub> 與 4-dimethylaminopyridine (DMAP) 為試劑加入至 lactide 或是乳酸的苯溶液，18-membered ring 的環狀低聚乳酸與 Na<sup>+</sup> 結合之錯合物產率可達 ~80%。<sup>13</sup> 此方法利用了前面所觀察到之現象加以改進，並且證明了在 Na<sup>+</sup> 的存在之下乳酸可

逆的聚合/環化反應產物會趨向與之結合的特殊大小環狀產物。

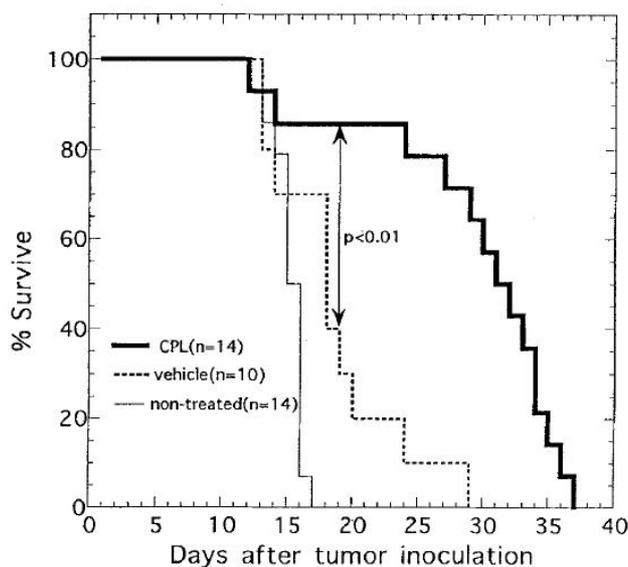
## (2) 環狀低聚乳酸相關生物測試

有關環狀低聚乳酸相關細胞、動物等測試的相關文獻不多，且絕大多數均為日本研究學者所著作，生物相關效果之測試文獻詳細整理可見於參考文獻 14，以下取自部分文獻結果說明：

在 1997 年，Takada 等人研究聚合數目 3~13 之間之環狀低聚乳酸對 pyruvate kinase, lactic dehydrogenase, anaerobic glycolysis, 腫瘤細胞的生長狀況以及接種腫瘤之老鼠存活狀況影響。文章中發現 pyruvate kinase 和 lactic dehydrogenase 活性均會被環狀低聚乳酸所抑制(圖十四)，且 FM3A 腹水腫瘤細胞解醣活性及細胞生長活性亦被抑制。更多實驗證實，接種 FM3A 腹水腫瘤細胞的老鼠在接受環狀低聚乳酸之後可存活更長的時間(圖十五)。<sup>1</sup> 這些實驗結果顯示了環狀低聚乳酸有成為抗 FM3A 腹水腫瘤細胞抑制劑的可能。

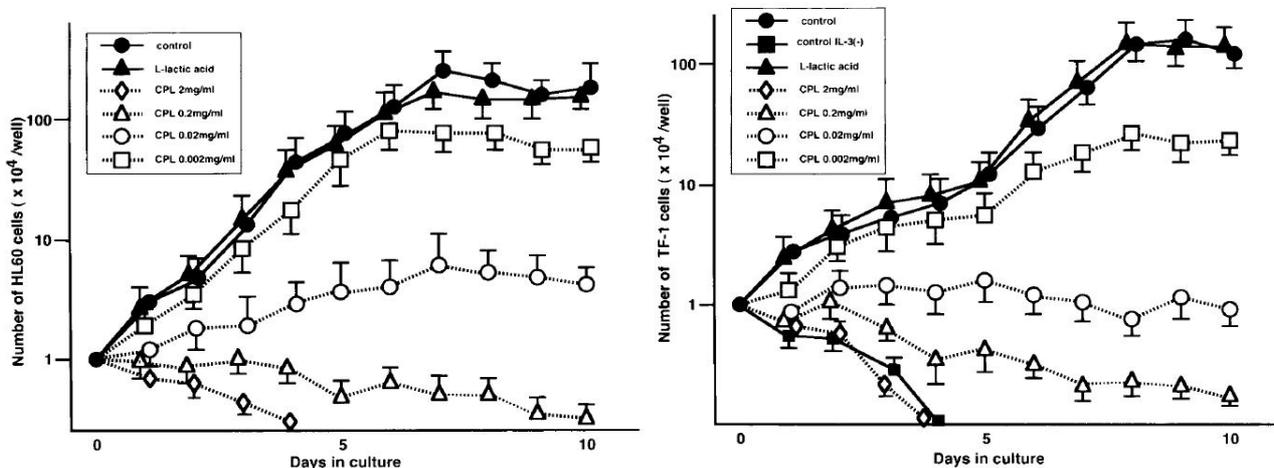


圖十四 環狀低聚乳酸 (CPL) 在 pyruvate kinase (PK,左圖)及 lactic dehydrogenase (LDH,右圖) 對 FM3A 腹水腫瘤細胞 (O) 及兔子肌肉細胞 (□) 活性的影響。圖片取自於參考文獻 1



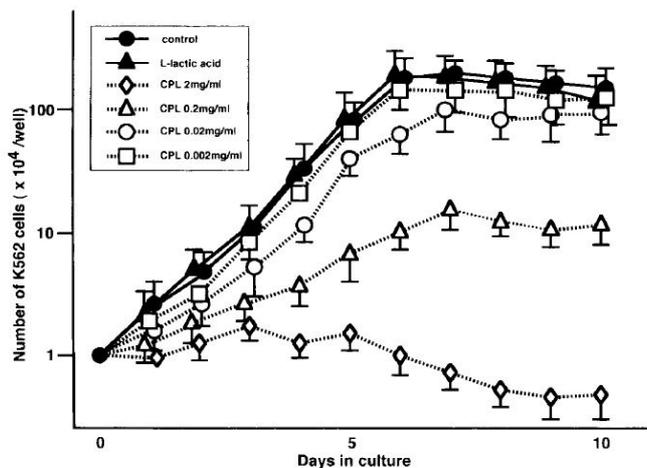
圖十五 環狀低聚乳酸對接種腫瘤細胞老鼠的影響。老鼠在接種 FM3A 細胞後，14 隻老鼠並未做任何處置 (non-treated)，10 隻老鼠僅以賦形劑處置 (vehicle)，而 14 隻老鼠則以 4 mg/animal 的環狀低聚乳酸處置 (CPL)。圖片取自於參考文獻 1

在 2000 年，Aizawa 等人研究了聚合數目 9 至 19 的環狀低聚乳酸對 leukemic 細胞生長的影響。HL60 及 TF-1 細胞的生長均在濃度 0.02 mg/ml 之環狀低聚乳酸下受到抑制(圖十六)，而 K562 細胞的生長在濃度 0.2 mg/ml 之環狀低聚乳酸下受到抑制(圖十七)。<sup>3</sup> 這些結果顯示環狀低聚乳酸可能會成爲抑制 leukemic 細胞的有用試劑。



圖十六 在加入環狀低聚乳酸(CPL)後對 HL60 (左圖) 及 TF1 (右圖) 細胞生長速率影響。

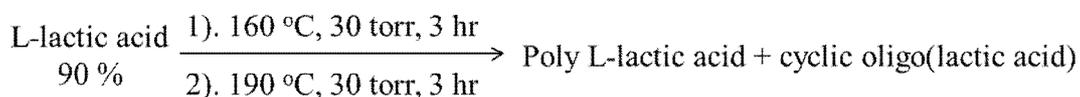
●:control, ▲:L-lactic acid 1.0 mg/mL, ◇ :CPL 2.0 mg/mL, △ : CPL 0.2 mg/mL, ○: CPL 0.02 mg/mL, □ : CPL 0.002 mg/mL。圖片取自於參考文獻 3



圖十七 加入環狀低聚乳酸(CPL)對 K562 細胞生長影響。● : control, ▲ : L-lactic acid 1.0 mg/mL, ◇ : CPL 2.0 mg/mL, △ : CPL 0.2 mg/mL, ○ : CPL 0.02 mg/mL, □ : CPL 0.002 mg/mL。圖片取自於參考文獻 3

## 2. 環狀低聚乳酸之合成

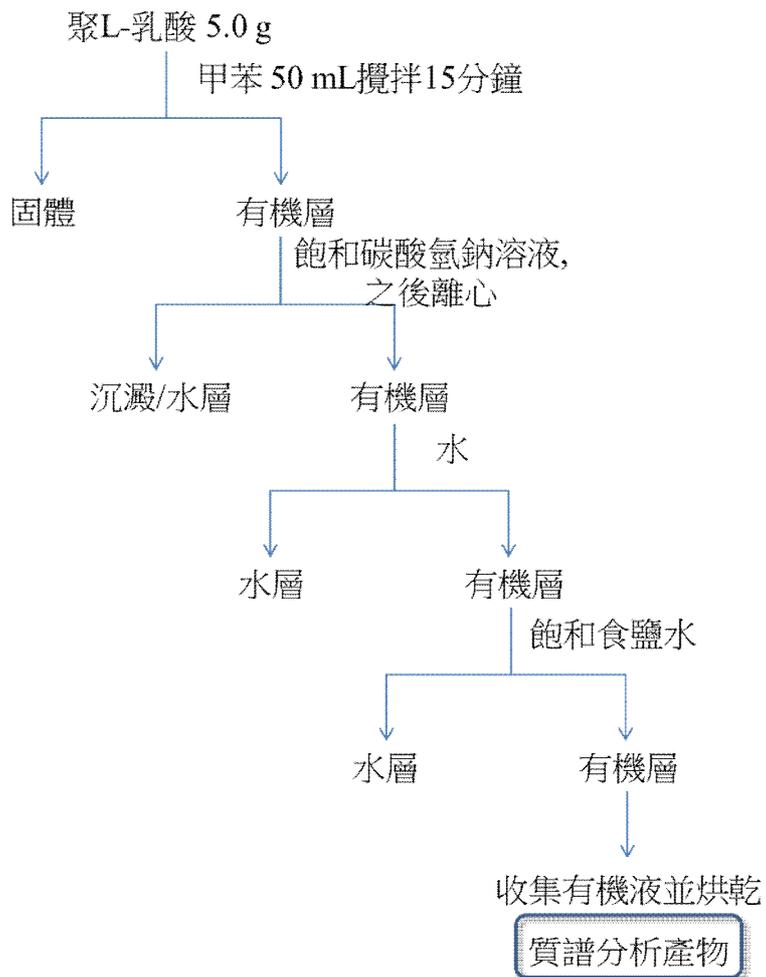
在實習過程中，乃是利用乳酸直接聚合，再以萃取的方式取得環狀低聚乳酸。一開始直接聚合的條件是將 90 % L-乳酸加熱至 160 °C 後壓力降至 30 torr 的低壓下反應 3 個小時，再將溫度升至 190 °C 反應 3 個小時，實驗裝置如圖十八，反應式可由以下式子表示：





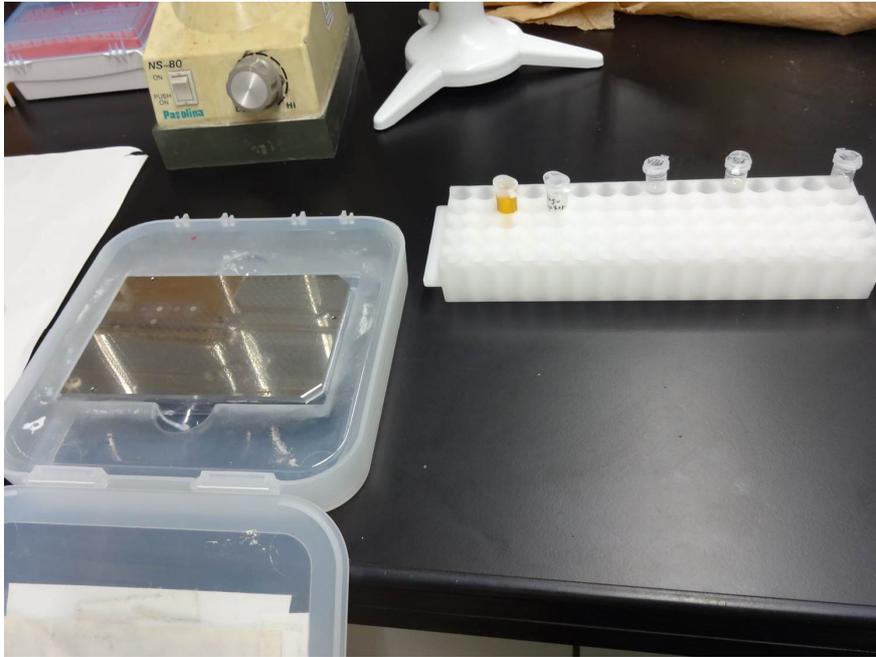
圖十八 直接聚合乳酸實驗裝置圖

反應完成後，收集冷卻後之聚 L-乳酸並將之搗碎、磨成細粉後，取一定量(在此部分是 5 克)之聚 L-乳酸進行接下來之萃取。其萃取的方式如下流程所述：

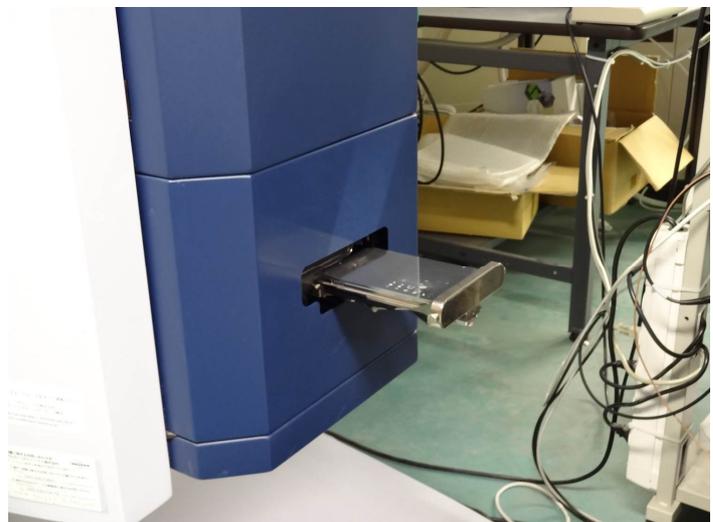


流程一 環狀低聚乳酸萃取流程

萃取 5 克此反應之聚 L-乳酸產物，僅得到 55.6 毫克環狀低聚 L-乳酸(c-OLLA)，產率明顯偏低。在這邊則是利用 MALDI-TOF 質譜檢測環狀低聚乳酸，將待測樣品、Matrix 及離子化試劑(ionizer)放置於鋼製樣品盤中(圖十九)同一點後風乾，這裡使用 IAA (3-indoleacrylic acid) 做為輔助之 Matrix，NaI 則是做為離子化試劑，每次測試樣品同時亦須製備標準品(這裡使用 Angiotensin II,  $m/z = 1046.5423$ )做為校正質譜分子量之用，完成樣品製備後即送至公用設備之 MALDI-TOF 質譜儀進行分析(圖二十)。

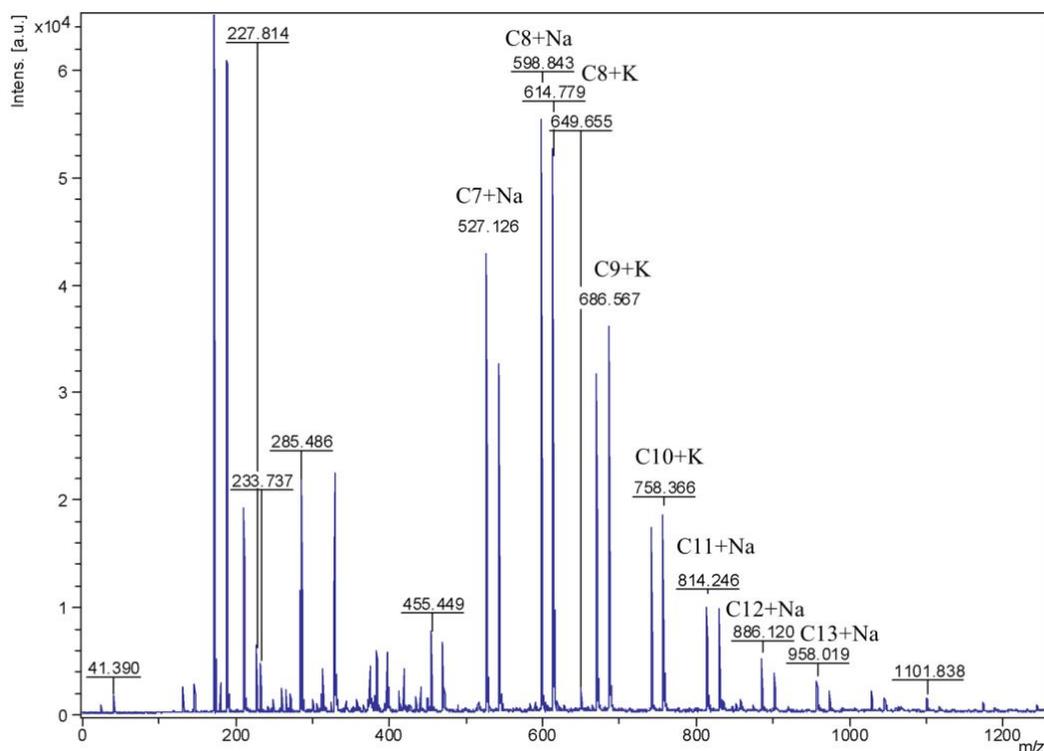


圖十九 MALDI-TOF 質譜鋼製樣品盤



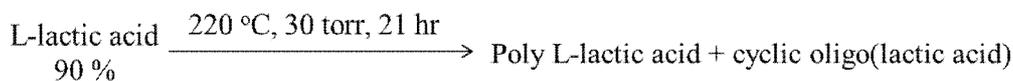
圖二十 MALDI-TOF 質譜儀，右圖為放置樣品盤進入質譜儀本體過程

得到質譜分析結果後，可利用附錄一之線性、環狀聚乳酸理論質量計算表來對照產物之分佈，c-OLLA 的 MALDI-TOF 質譜及分析結果如下圖二十一，可見產物以環狀低聚乳酸為主，從圖譜亦可見環狀乳酸聚和數目分佈比例。

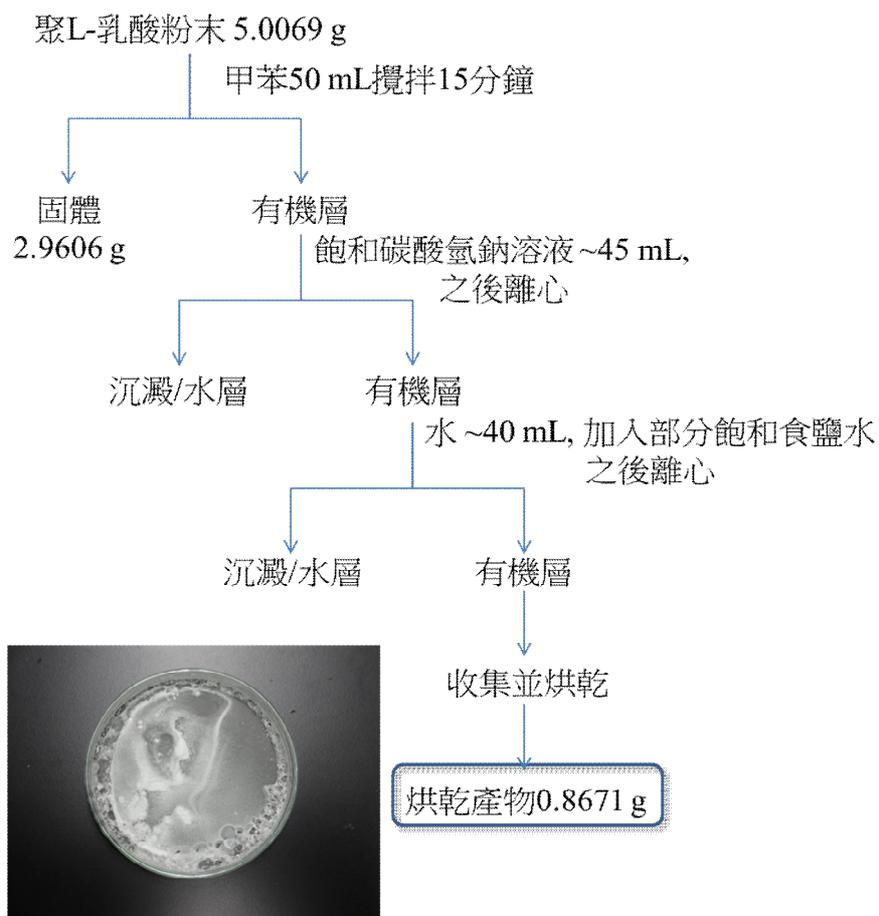


圖二十一 c-OLLA 的 MALDI-TOF 質譜圖

由前所述，L-乳酸利用該條件直接聚合之產物經萃取後取得之環狀低聚 L-乳酸產率不高，每 5 克聚 L-乳酸僅能取得 55.6 毫克之環狀低聚 L-乳酸。在前人文獻中，有利用 100-220 °C 不同溫度下將 DL-乳酸直接聚合並觀察線性及環狀聚乳酸的分佈，其結果顯示在超過 200 °C 下環狀聚乳酸有明顯增加的情形(如圖七)<sup>4</sup>。雖在其他文獻中亦有利用催化劑下合成環狀低聚乳酸，但在短期能調整最快的方式還是透過反應過程中簡單升溫以取得產物。因此，在聚合 L-乳酸的過程中反應溫度提升至 220 °C，時間則參照文獻採用 21 小時，並觀察獲得產物和之前溫度較低的狀況下有何不同。反應條件式則改變如下：



反應完成後產物顏色較之前稍偏淡黃，與前面處理步驟相同，將聚合後之產物聚 L-乳酸搗碎並磨成細粉後，取一定量(5 克)進行萃取：產物先以定量甲苯溶解後，過濾除去不溶固體，溶液再以飽和碳酸氫鈉及水萃取。合成後之聚 L-乳酸部分溶解於甲苯，與之前產物不同的地方是，在第二次和水萃取的階段會產生相當的沉澱，即使加入少量飽和食鹽水試圖破除乳化亦失敗(圖二十二)，須進行離心以取得上層澄清液，萃取後之有機層產物經乾燥後得將近 0.87 克白色固體，產物量明顯較之前提升至少十倍以上，萃取流程及產物照片如流程二所示。



流程二 聚合反應溫度 220 °C 下聚 L-乳酸萃取環狀低聚 L-乳酸流程



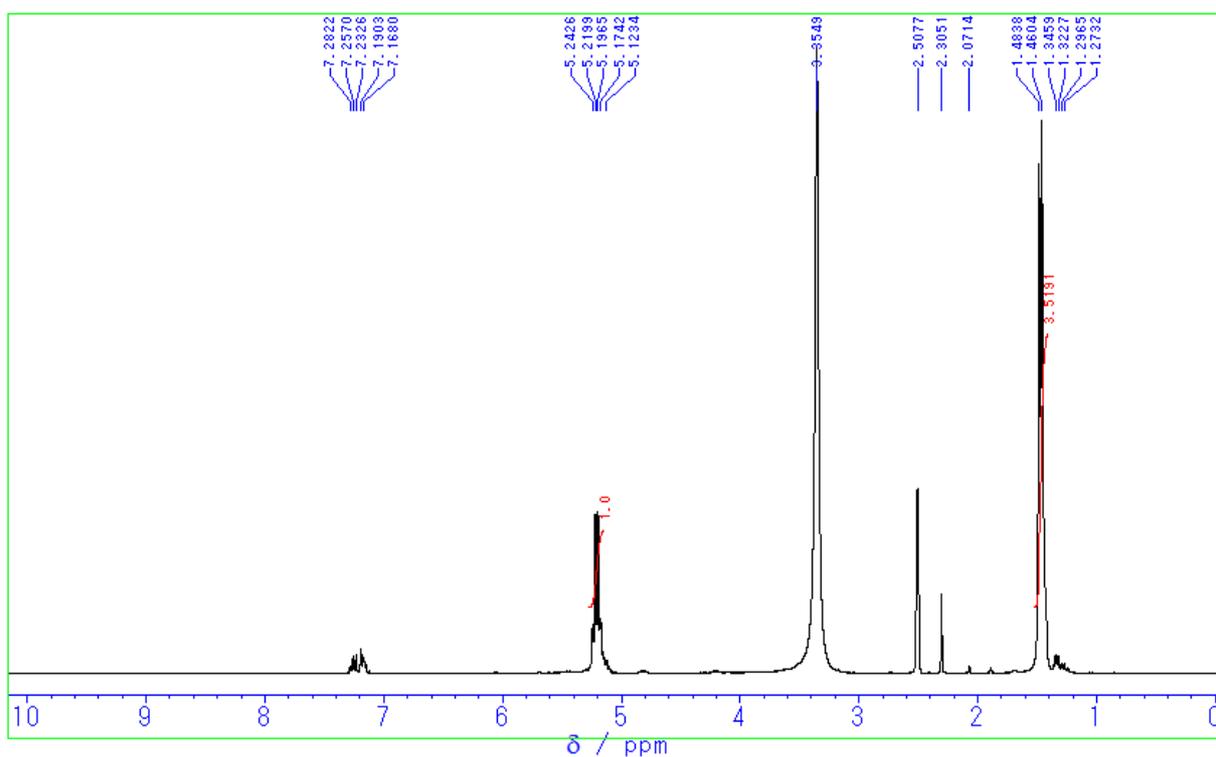
圖二十二 有機層在第二次和水萃取後照片(部分飽和食鹽水加入試圖破除乳化現象)

針對產物分析，我們利用  $^1\text{H NMR}$ (圖二十三)、MALDI-TOF 與 ESI 質譜等方式進行檢測。圖二十四為  $^1\text{H NMR}$  圖譜環狀產物的氫核磁共振訊號，其中顯示有少量未抽乾之甲苯(7.1-7.3 ppm 左右)。



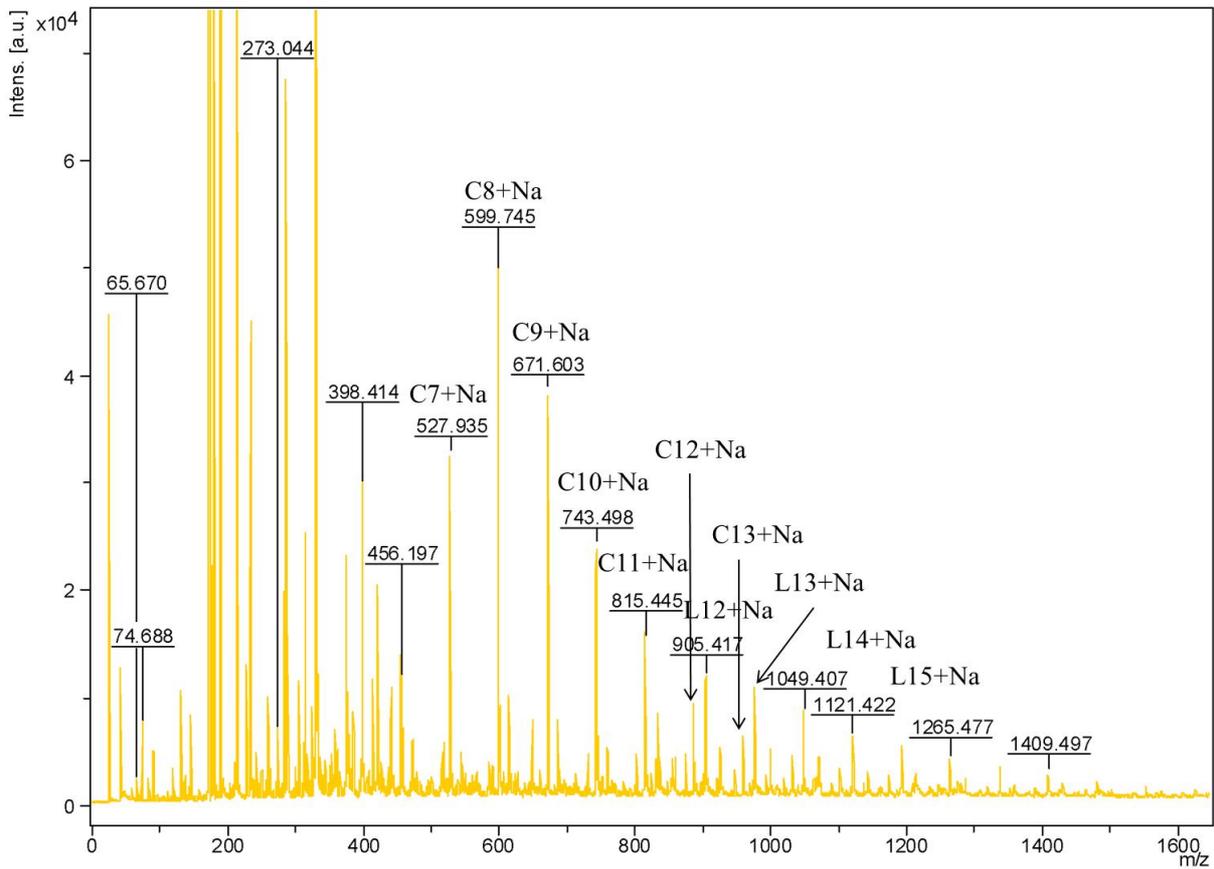
圖二十三 NMR 設備 (300 MHz)

140807\_c0LLA0728



圖二十四 聚合反應溫度 220 °C 下之 c-OLLA (300 MHz, DMSO- $d_6$ )

此次取得之 c-OLLA 的 MALDI-TOF 質譜及分析結果如下圖二十五，產物雖以環狀低聚 L-乳酸為主，但從圖譜亦可見到部分線性聚合不純物的存在，特別是當聚合數目增加時線性聚合不純物亦愈明顯。



圖二十五 聚合反應溫度 220 °C 下之 c-OLLA 的 MALDI-TOF 質譜圖

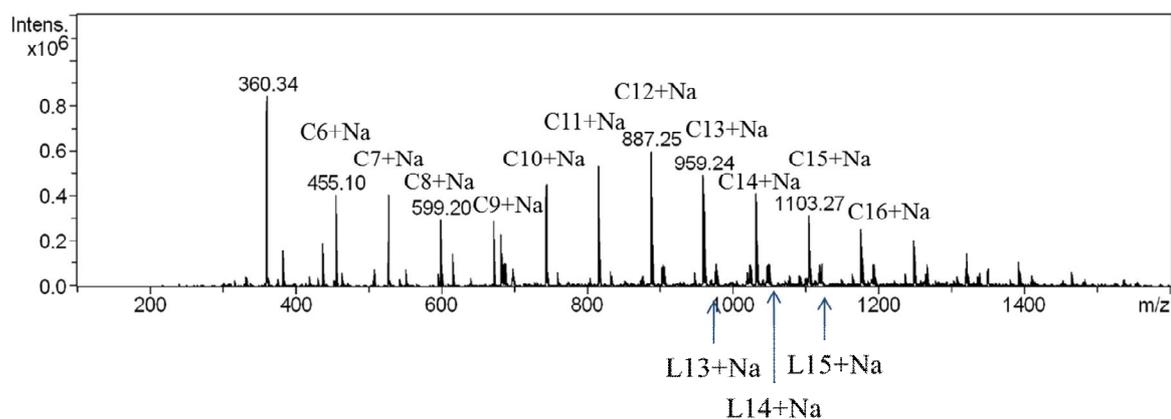
產物亦使用 ESI 質譜(設備如圖二十六)進行檢測，量測 ESI 質譜樣品濃度僅須 1 ppm，經過適當溶劑稀釋後不需任何輔助試劑即可檢測。圖譜亦顯示合成之 c-OLLA 有少部分線性聚合不純物的存在(圖二十七)。



圖二十六 ESI 質譜儀

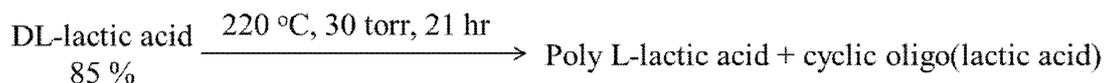
**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	100 m/z	Scan End	2200 m/z
Capillary Exit	140.0 V	n/a	n/a	Trap Drive	78.8
Accumulation Time	847 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

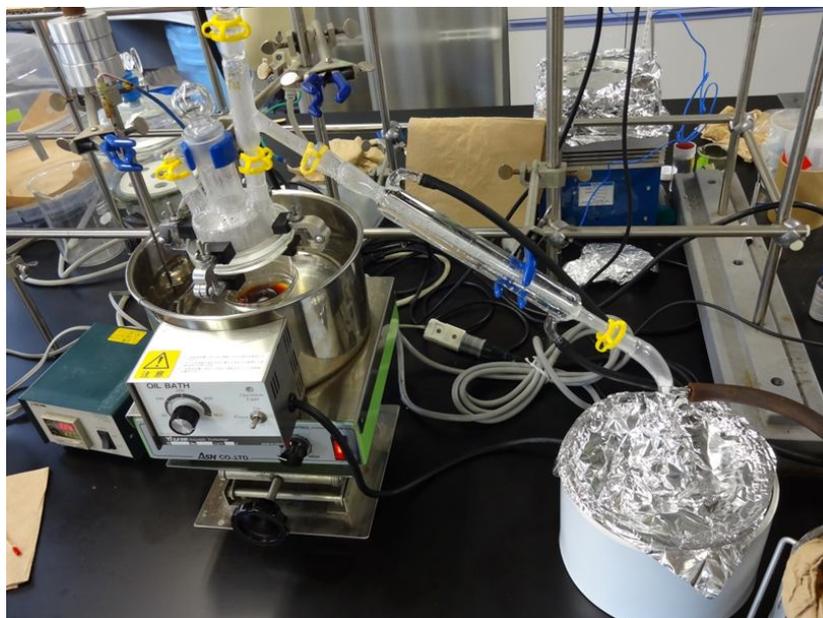


圖二十七 聚合反應溫度 220 °C 下之 c-OLLA 的 ESI 質譜圖

將起始物由 L-乳酸改成 DL-乳酸在同樣的條件下進行直接聚合反應，反應條件式如下：



比較意外的是，經過隔夜反應後，反應瓶中聚合乳酸顏色變為褐色(圖二十八)。與之前步驟相同，經過收集、搗碎並磨成粉末，圖二十九可明顯見到 L-乳酸與 DL-乳酸在 220 °C 高溫下聚合產物顏色的不同。

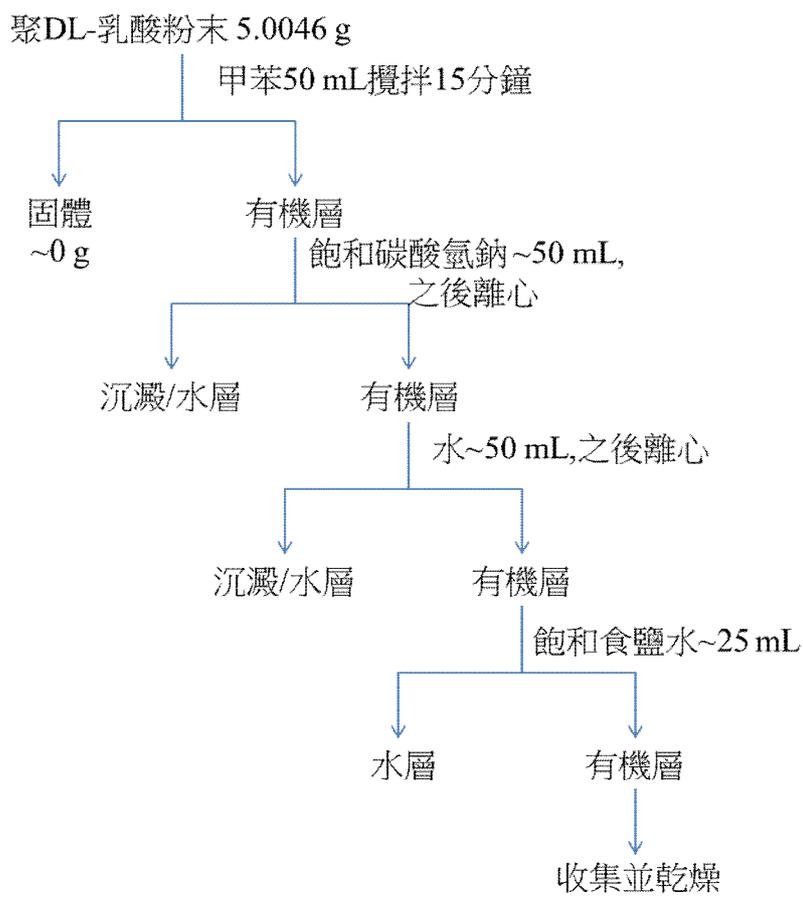


圖二十八 DL-乳酸聚合反應，反應液變為褐色



圖二十九 220 °C 合成之聚 L-乳酸(左)與聚 DL-乳酸(右)

取 5 克合成之聚 DL-乳酸粉末進行與相同方式的萃取：產物先以定量甲苯溶解後，過濾除去不溶固體，溶液再以飽和碳酸氫鈉、水及飽和食鹽水萃取。與之前產物不同的地方是，合成後之聚 DL-乳酸可完全溶解於甲苯，在第一次飽和碳酸氫鈉、第二次和水萃取的階段會產生大量的沉澱，須進行離心以取得上層澄清液，萃取後之有機層產物經乾燥後得將近 0.49 克黏稠固體，產物量亦較之前提升至少將近九~十倍，萃取流程及產物照片如流程三所示。

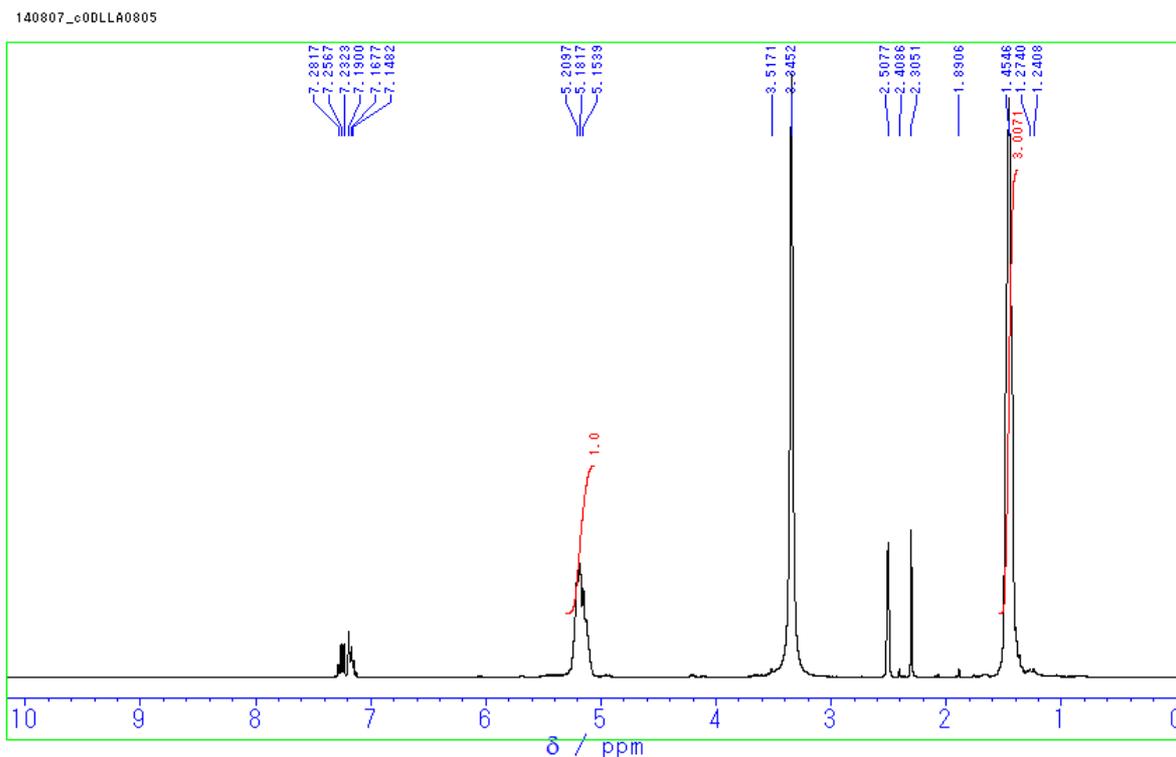


乾燥產物 0.488 g

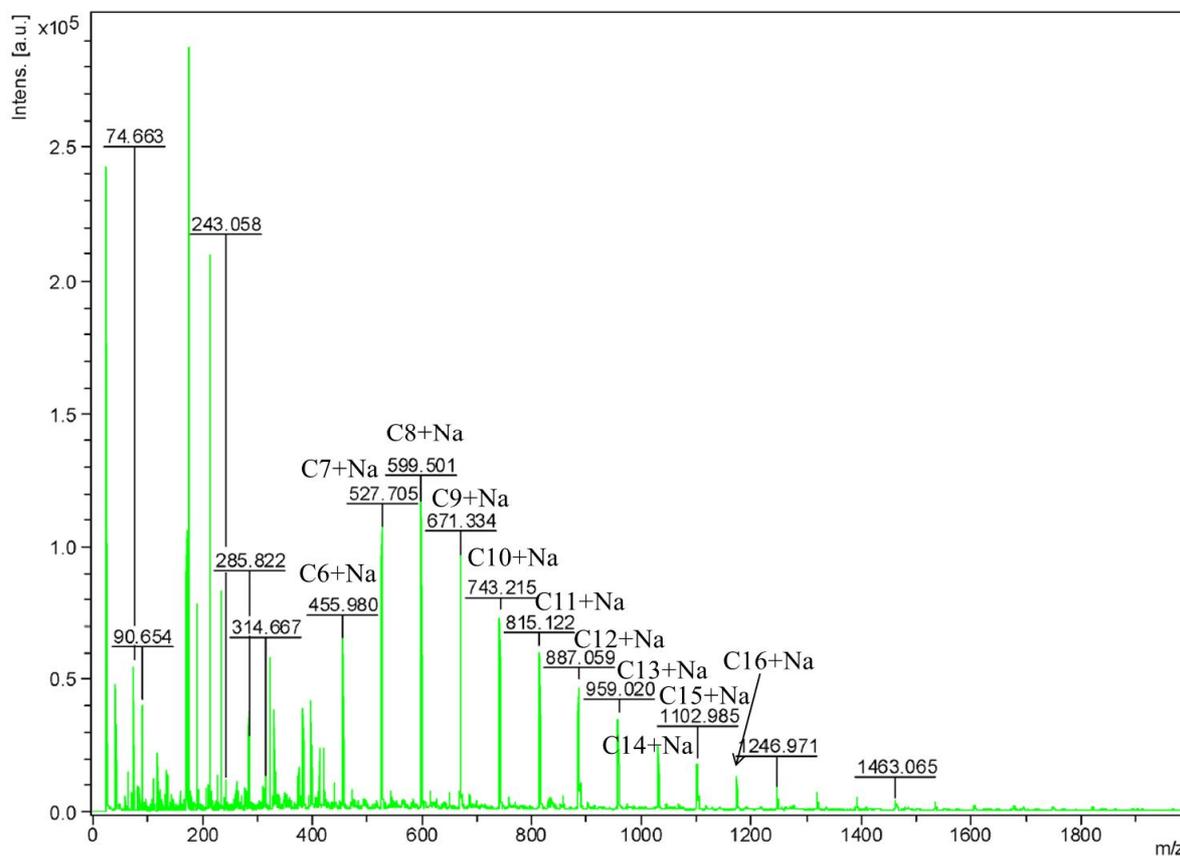
流程三 聚合反應溫度 220 °C 下聚 DL-乳酸萃取環狀低聚 DL-乳酸流程

萃取後之環狀低聚 DL-乳酸(c-ODLLA)亦利用  $^1\text{H NMR}$ 、MALDI-TOF 與 ESI 質譜等方式

進行分析。其中  $^1\text{H}$  NMR 圖譜(圖三十)顯示仍有少量甲苯殘留外，MALDI-TOF(圖三十一)及 ESI 質譜(圖三十二)均顯示產物幾乎為環狀低聚 DL-乳酸，並未發現線性聚合乳酸產物。



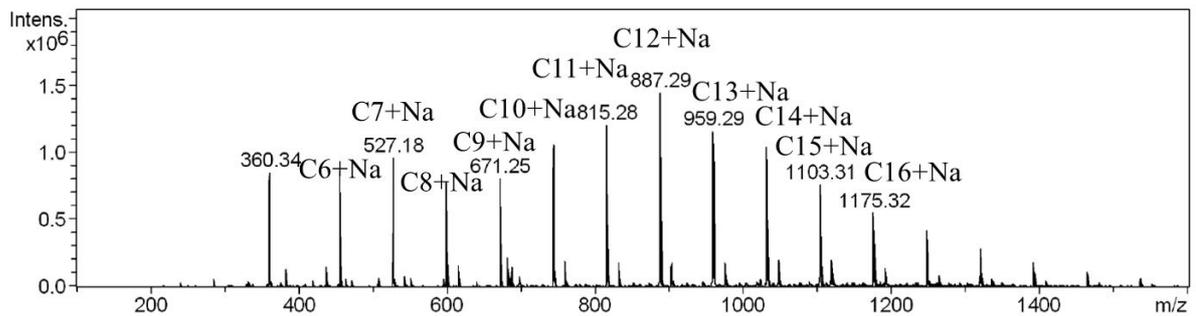
圖三十 聚合反應溫度 220 °C 下之 c-ODLLA (300 MHz, DMSO- $d_6$ )



圖三十一 聚合反應溫度 220 °C 下之 c-ODLLA 的 MALDI-TOF 質譜圖

### Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	100 m/z	Scan End	2200 m/z
Capillary Exit	140.0 V	n/a	n/a	Trap Drive	78.8
Accumulation Time	456 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off



圖三十一 聚合反應溫度 220 °C 下之 c-ODLLA 的 ESI 質譜圖

在同樣溫度、同樣壓力及相同反應時間等條件下，亦將起始物改成 90 % D-乳酸進行直接聚合反應。反應完成之產物與 L-乳酸直接聚合顏色相似，為淡黃色(圖三十二)。然而由於時間關係，並未進行萃取反應，僅將合成後之聚 D-乳酸收集、搗碎並磨成粉末。依據前述聚 L-及聚 DL-乳酸的經驗，相信若取 5 克之聚 D-乳酸進行萃取將可得到約數百毫克之環狀聚 D-乳酸成品。



圖三十二 D-乳酸聚合反應，反應液變為淡黃色

在此短期實習期間，利用過去文獻的做法，乳酸在 220 °C 高溫下進行直接聚合反應，取 5 克聚合後聚乳酸萃取後約可得到數百毫克環狀低聚乳酸，明顯和較低溫度狀態下(200 °C 以下)為高，也證實了文獻反應條件的可行性。除環狀低聚乳酸相關合成實驗外，小原教授實驗室認為環狀低聚乳酸孔洞大小與環糊精(cyclodextrin)化合物近似，因此可能會與一些受體分子如金屬離子、有機小分子等進行結合；另外在生物實驗中，使用大腸桿菌(*E. coli.*)進行環狀低聚乳酸相關生物細胞測試，但結合測試與生物實驗目前均未有一致性結果，相關化學與生物實驗正進行測試中。

### 三、心得

本次公差得以順利進行，職非常感謝本所化學組組內長官、同仁指導、協助，提供經驗與意見交流，茲將重要的心得摘錄如下：

(一)、針對乳酸純化分離這部分，小原教授列舉了許多純化方法，例如：乳酸鈣鹽化合物加硫酸與甲醇除去不溶硫酸鈣鹽後再進行酯化法、乳酸鉍鹽化合物加酸與丁醇進行酯化法、直接蒸餾乳酸法、電透析法、溶劑萃取法…等，最爲目前主流生產的方法爲上述二種的酯化方法，其他方法多見於文獻中，許多技術的 know how 都爲生產廠商內部資料且未見於文獻中。關於電透析部分，雖然小原教授過去有發展出一套電透析方法，並因此法獲得日本生物工學會技術賞，但也發現電透析的膜容易被發酵液的蛋白質、脂質等生化大分子破壞造成膜的劣化，降低長久運轉的可行性。根據過去的經驗，小原教授認爲若要將乳酸發酵液進行純化分離的工作，乳酸鉍發酵液使用丁醇進行酯化反應的方法是最爲可行的。

(二)、文獻搜尋相當重要，搜尋過去相關領域的文獻可發現別人研究內容與己方研究的關聯性，參考別人的成果可省卻許多不必要的路徑，減少走錯方向的可能性，更可在研究方向毫無頭緒時提供重要的訊息指引，也就是「站在巨人的肩膀上」，利用前人的資訊讓自己的研究看得更高更遠。

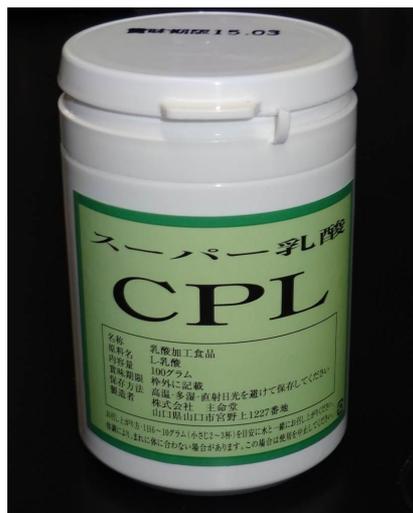
(三)、在日本停留期間，小保方晴子所發表的 STAP 論文造假事件仍在日本有相當廣泛的討論，職所在實習的京都工藝纖維大學亦針對此事件舉辦過研討說明會，研究人員對此事件均獲得相當程度的震撼，而小保方的指導教授笹井芳樹也因此事件自殺。研究人員若在過去的研究成果被他人發現有造假或虛偽不實，對研究人員與所屬單位、機構之信譽及聲望將是非常嚴重的傷害，任何人將不會相信該名研究人員的研究成果，連帶也會影響到所屬機構的聲譽，即使將來該機構想要發表相關成果，也會被外界打上很大的問號。有鑑於此，研究過程中若得到好的結果，必須進行再確認以確保結果是否具再現性，若是未經確認就急於發表，若他人發現其中有疑慮將會衍生出更多的問題，寧可沒有好的結果也不要爲了獲得好結果調整或修改數據內容。論文造假事件是對所有研究人員的警惕。

(四)、日本自從福島事故之後停用核能發電，電力供應十分緊張，在公共場所時常見到節約能源的標語。許多公共場所如：地鐵等經常可見到弱冷(幾乎不開冷氣)車廂，一些店家亦響應節約能源將空調溫度調高，讓人幾乎感覺不到冷氣，職所在實習學校實驗室空調溫度亦在 27~28 °C 之間，而關西電力公司每度電費費用亦較台灣貴上 2~3 倍，相關景象令人印象深刻，值得深思。

## 四、建議事項

茲將本次日本公差的觀察及心得歸納出以下建議事項，以供長官和同仁參考：

(一)、**環狀低聚乳酸相關或有繼續研究的可看性，但須確認其中效應。**在日本，根據過去的研究與生物測試成果，有廠商將環狀低聚乳酸包裝成健康食品，日本名稱爲『環狀重合乳酸』(CPL，圖三十三)，台灣亦有廠商進口做爲化妝水成分。然而，根據小原教授實驗室研究生透露，他們嘗試過分析其中組成，發現仍以線性低聚乳酸居多。此一訊息十分震撼，過去生物研究結果似乎需重新檢視。因此，確認純的環狀乳酸成品對生物的效應仍將是值得研究探討的部分。



圖三十三 日本販售的健康食品『環狀重合乳酸』CPL

(二)、**整合合成化學與分析技術相關設備與人才方可從事乳酸後端開發工作。**在日本實習期間，除合成乳酸聚合相關衍生物外，分析並鑑定環狀低聚乳酸亦是一個重要課題。期間利用 NMR、MALDI-TOF 質譜、ESI 質譜等方式進行鑑定，其中技術需分析化學相關人才的參與。由此可知，乳酸聚合等後端應用研究開發需有機合成、高分子化學、分析化學甚至還需生物細胞測試等相關方面設備與人才整合方有產出研究成果的機會。所內化學組有合成化學、分析化學實驗室與相關人力，若能進行完全整合將對未來高質化生質化學品研究開發有相當程度的助益。

(三)、**經驗傳承與實驗交接十分重要。**在實習期間的末了，實驗室正進行搬遷工作，搬遷時發現極多過去畢業研究生所留下的樣品，清洗與丟棄這些樣品造成實驗室學生搬遷的困擾。所內有相當多設備與技術需人員維持，近年人員的離退對這些設備與技術的維持將造成衝擊，且實驗過程留下的樣品若未能及時交接或處理將對留下來的人員造成困擾。因此，針對人員離退建立一套交接與傳承機制對所內設備、技術維持與實驗室整備等是十分重要的。

(四)、**持續與國外機構實習交流以獲得最新相關研究訊息。**在國外進行實習與研究交流，可拓展相關人脈與研究視野，過去小原教授在業界與學術界累積了相當人脈，因此獲得許多經驗，對於研究有相當幫助。所內如要避免閉門造車，提升研究題材的深度廣度，與國外研究機構持續交流實習是必須的。

## 五、附 錄

附錄一、線性及環狀低聚乳酸質量理論計算值表

linear	n	linear						
NH4		H	2Na-H	Na	K	Rb	Cs	Ca
18	0	1	44.98	22.99	39.10	85.47	132.91	40.08
108.1	1	91.1	135.0	113.1	129.2	175.5	223.0	65.1
180.1	2	163.1	207.1	185.1	201.2	247.6	295.0	101.1
252.2	3	235.2	279.2	257.2	273.3	319.7	367.1	137.1
324.3	4	307.3	351.2	329.2	345.4	391.7	439.2	173.2
396.3	5	379.3	423.3	401.3	417.4	463.8	511.2	209.2
468.4	6	451.4	495.4	473.4	489.5	535.8	583.3	245.2
540.4	7	523.4	567.4	545.4	561.5	607.9	655.4	281.3
612.5	8	595.5	639.5	617.5	633.6	680.0	727.4	317.3
684.6	9	667.6	711.5	689.6	705.7	752.0	799.5	353.3
756.6	10	739.6	783.6	761.6	777.7	824.1	871.5	389.4
828.7	11	811.7	855.7	833.7	849.8	896.2	943.6	425.4
900.8	12	883.8	927.7	905.7	921.9	968.2	1015.7	461.4
972.8	13	955.8	999.8	977.8	993.9	1040.3	1087.7	497.4
1044.9	14	1027.9	1071.9	1049.9	1066.0	1112.4	1159.8	533.5
1116.9	15	1099.9	1143.9	1121.9	1138.0	1184.4	1231.9	569.5
1189.0	16	1172.0	1216.0	1194.0	1210.1	1256.5	1303.9	605.5
1261.1	17	1244.1	1288.1	1266.1	1282.2	1328.5	1376.0	641.6
1333.1	18	1316.1	1360.1	1338.1	1354.2	1400.6	1448.0	677.6
1405.2	19	1388.2	1432.2	1410.2	1426.3	1472.7	1520.1	713.6
1477.3	20	1460.3	1504.2	1482.3	1498.4	1544.7	1592.2	749.7
1549.3	21	1532.3	1576.3	1554.3	1570.4	1616.8	1664.2	785.7
1621.4	22	1604.4	1648.4	1626.4	1642.5	1688.9	1736.3	821.7
1693.4	23	1676.4	1720.4	1698.4	1714.5	1760.9	1808.4	857.8
1765.5	24	1748.5	1792.5	1770.5	1786.6	1833.0	1880.4	893.8
1837.6	25	1820.6	1864.6	1842.6	1858.7	1905.0	1952.5	929.8
1909.6	26	1892.6	1936.6	1914.6	1930.7	1977.1	2024.5	965.9
1981.7	27	1964.7	2008.7	1986.7	2002.8	2049.2	2096.6	1001.9
2053.8	28	2036.8	2080.7	2058.8	2074.9	2121.2	2168.7	1037.9
	29	2108.8	2152.8	2130.8	2146.9	2193.3	2240.7	1074.0
	30	2180.9	2224.9	2202.9	2219.0	2265.4	2312.8	1110.0
	31	2253.0	2296.9	2274.9	2291.1	2337.4	2384.9	1146.0
	32	2325.0	2369.0	2347.0	2363.1	2409.5	2456.9	1182.0
	33	2397.1	2441.1	2419.1	2435.2	2481.5	2529.0	1218.1
	34	2469.1	2513.1	2491.1	2507.2	2553.6	2601.1	1254.1
	35	2541.2	2585.2	2563.2	2579.3	2625.7	2673.1	1290.1
	36	2613.3	2657.2	2635.3	2651.4	2697.7	2745.2	1326.2
	37	2685.3	2729.3	2707.3	2723.4	2769.8	2817.2	1362.2

cyclic	n	cyclic						
NH4		H	2Na-H	Na	K	Rb	Cs	Ca
18	0	1	44.98	22.99	39.10	85.47	132.91	40.08
90.1	1	73.1	117.0	95.1	111.2	157.5	205.0	56.1
162.1	2	145.1	189.1	167.1	183.2	229.6	277.0	92.1
234.2	3	217.2	261.2	239.2	255.3	301.7	349.1	128.1
306.3	4	289.3	333.2	311.2	327.4	373.7	421.2	164.2
378.3	5	361.3	405.3	383.3	399.4	445.8	493.2	200.2
450.4	6	433.4	477.4	455.4	471.5	517.8	565.3	236.2
522.4	7	505.4	549.4	527.4	543.5	589.9	637.4	272.3
594.5	8	577.5	621.5	599.5	615.6	662.0	709.4	308.3
666.6	9	649.6	693.5	671.6	687.7	734.0	781.5	344.3
738.6	10	721.6	765.6	743.6	759.7	806.1	853.5	380.4
810.7	11	793.7	837.7	815.7	831.8	878.2	925.6	416.4
882.8	12	865.8	909.7	887.7	903.9	950.2	997.7	452.4
954.8	13	937.8	981.8	959.8	975.9	1022.3	1069.7	488.4
1026.9	14	1009.9	1053.9	1031.9	1048.0	1094.4	1141.8	524.5
1098.9	15	1081.9	1125.9	1103.9	1120.0	1166.4	1213.9	560.5
1171.0	16	1154.0	1198.0	1176.0	1192.1	1238.5	1285.9	596.5
1243.1	17	1226.1	1270.1	1248.1	1264.2	1310.5	1358.0	632.6
1315.1	18	1298.1	1342.1	1320.1	1336.2	1382.6	1430.0	668.6
1387.2	19	1370.2	1414.2	1392.2	1408.3	1454.7	1502.1	704.6
1459.3	20	1442.3	1486.2	1464.3	1480.4	1526.7	1574.2	740.7
1531.3	21	1514.3	1558.3	1536.3	1552.4	1598.8	1646.2	776.7
1603.4	22	1586.4	1630.4	1608.4	1624.5	1670.9	1718.3	812.7
1675.4	23	1658.4	1702.4	1680.4	1696.5	1742.9	1790.4	848.8
1747.5	24	1730.5	1774.5	1752.5	1768.6	1815.0	1862.4	884.8
1819.6	25	1802.6	1846.6	1824.6	1840.7	1887.0	1934.5	920.8
1891.6	26	1874.6	1918.6	1896.6	1912.7	1959.1	2006.5	956.9
1963.7	27	1946.7	1990.7	1968.7	1984.8	2031.2	2078.6	992.9
2035.8	28	2018.8	2062.7	2040.8	2056.9	2103.2	2150.7	1028.9
	29	2090.8	2134.8	2112.8	2128.9	2175.3	2222.7	1065.0
	30	2162.9	2206.9	2184.9	2201.0	2247.4	2294.8	1101.0
	31	2235.0	2278.9	2256.9	2273.1	2319.4	2366.9	1137.0
	32	2307.0	2351.0	2329.0	2345.1	2391.5	2438.9	1173.0
	33	2379.1	2423.1	2401.1	2417.2	2463.5	2511.0	1209.1
	34	2451.1	2495.1	2473.1	2489.2	2535.6	2583.1	1245.1
	35	2523.2	2567.2	2545.2	2561.3	2607.7	2655.1	1281.1
	36	2595.3	2639.2	2617.3	2633.4	2679.7	2727.2	1317.2
	37	2667.3	2711.3	2689.3	2705.4	2751.8	2799.2	1353.2

## 附錄二、參考文獻

1. Takada, S.; Nagato, Y.; Yamamura, M. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1997**, *43*, 9.
2. Hoskins, J. N.; Grayson S. M. *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 289.
3. Aizawa, S.; Shimizu, N.; Handa, H.; Hiramoto, M.; Hoshi, H.; Nagasu, M.; Kanno, H.; Nagasu, Y.; Imanishi, Y. *Hematol. Oncol.* **2000**, *18*, 51.
4. Ke'ki, S.; Bodna' r, I.; Borda, J.; Dea'k, G.; Zsuga, M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2833.
5. (a) Watanabe, M.; Takano, J.; Ishihara, Y.; Murakami, M. *US 6,825,314* **2004**. (b) Watanabe, M.; Takano, J.; Ishihara, Y.; Murakami, M. *US 6,861,538* **2005**.
6. Osaka, I.; Watanabe, M.; Takama, M.; Murakami, M.; Arakawa, R. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 1369.
7. Inanaga, J.; Hirata K.; Saeki H.; Katsuki T.; Yamaguchi M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989.
8. Osaka, I.; Yoshimoto, A.; Watanabe, M.; Takama, M.; Murakami, M.; Kawasaki, H.; Arakawa, R. *J. Chromatogr. B* **2008**, *870*, 247.
9. Csihony, S.; Culkin, D. A.; Sentman, A. C.; Dove, A. P.; Waymouth, R. M.; Hedrick, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9079.
10. Culkin, D. A.; Jeong, W.; Csihony, S.; Gomez, E. D.; Balsara, N. P.; Hedrick J. L.; Waymouth, R. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2627.
11. Jeong, W.; Hedrick J. L.; Waymouth, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8414.
12. Chisholm, M. H.; Gallucci, J. C.; Yin, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15315.
13. Chisholm, M. H.; Gallucci, J. C.; Yin, H. *Dalton Trans.* **2007**, 4811.
14. 野嶽勇一，深澤昌史，榊原隆三 長崎国際大学論叢 **2010**, *10*, 239.