

出國報告（出國類別：實習）

赴日本大阪大學應用化學系研習富勒
烯修飾及核磁共振光譜鑑定技術

服務機關：核能研究所

姓名職稱：曾俊豪 研究助理

派赴國家：日本

出國期間：106年8月25日~106年9月24日

報告日期：106年10月11日

摘要

本次出國公差前往日本大阪大學櫻井英博實驗室學習富勒烯衍生物的製備與鑑定。主要學習富勒烯外殼修飾的反應操作，例如 Bingel-Hirsch 反應、Prato 反應、水溶性富勒烯的製備及光譜、質譜鑑定。預期效益為了解富勒烯衍生物在生醫或造影劑設計上的應用，例如水溶性富勒烯可做為藥物輸送的載體可於水溶液中形成有序的構造，包覆小分子藥物；富勒烯的外殼本身可做多次修飾，能夠鍵結上不同配位子、生物活性分子，可以應用在造影劑的設計上。實習期程為 2017 年 8 月 25 日至 9 月 24 日。

目 次

摘要.....	i
一、目的.....	1
二、過程.....	2
三、心得.....	26
四、建議事項.....	29
五、附錄.....	30

一、目的

本次實習目的為:

- (1) 瞭解富勒烯衍生物製備與鑑定，評估水溶性富勒烯是否適合使用於造影劑設計。
- (2) 配合本所新購之 500 MHz NMR，可用以判斷富勒烯衍生物或其他富勒烯-小分子藥物耦合物的結構鑑定。
- (3) 與外國學者建立聯絡管道，有助未來交流或增加合作機會。

本次實習選擇前往日本大阪大學櫻井英博實驗室，櫻井教授是催化、核磁共振光譜領域的學者，專長為金屬奈米團簇催化反應、富勒烯次結構分子碗的合成、物性鑑定及應用。發表文獻有多篇被選為期刊封面。

櫻井實驗室在富勒烯化學、製備相關衍生物的反應操作、產物鑑定均有豐富的經驗。本次實習內容主要為富勒烯殼外修飾的基本反應操作，如 Bingel-Hirsch 反應、Prato 反應、Grignard 反應等。各項反應操作、加成產物的製備、分離與光譜、質譜鑑定。富勒烯由於獨特的球狀結構，可在殼外修飾成分子平台，鍵結多價小分子藥物或是直接做為包覆小分子藥物的運送載體，若和內嵌金屬富勒烯配合，在造影劑設計上有更廣的應用可能。

向櫻井實驗室學習富勒烯的殼外修飾反應，揭示了在造影劑設計上，除了用 linker 來連接生物活性分子、配位子基團外，也可考慮將生物活性分子、配位子基團逐一修飾在外殼上的可能性，由於富勒烯外殼可以進行多次、逐步的修飾，相信用途比一般單純的 linker 廣，可應用於本所多價醣類造影劑的設計。

預期效益為瞭解富勒烯衍生物在生醫或造影劑設計上的應用，例如水溶性富勒烯可做為藥物輸送的載體可於水溶液中形成有序的構造，包覆小分子藥物；富勒烯的外殼多次修飾後，能夠鍵結上不同配位子、生物活性分子，可以應用於造影劑的設計。

二、過程

(一) 每日行程

每日行程摘要如表一所示：

日期	地點	活動摘要
8/25 (五)	台北-關西機場-大阪	桃園機場搭乘長榮航空(BR 178)抵達日本關西機場，搭乘 Limousine 巴士至大阪機場，轉乘大阪單軌電車抵達阪大醫院前站。前往大阪大學工學院應用化學所櫻井英博教授實驗室報到。
8/26 (六)	大阪大學	旁聽實驗室文獻報告。
8/28 (一)	大阪大學	實驗室成員應矢彰伸導，開始實習。 Bingel-Hirsch reaction (mono-adducts)
8/29 (二)	大阪大學	Bingel-Hirsch reaction (hexakis-adducts)
8/30 (三)	大阪大學	Bingel-Hirsch reaction (hexakis-adducts、mono-adducts)
8/31 (四)	大阪大學	Bingel-Hirsch reaction (hexakis-adducts)
9/1 (五)	大阪大學	分離、鑑定 hexakis-adducts
9/2 (六)	大阪大學	旁聽實驗室文獻報告、光譜測量 hexakis-adducts。
9/4 (一)	大阪大學	旁聽實驗室工作報告、質譜測量 hexakis-adducts、Bingel-Hirsch reaction (mono-adducts)
9/5 (二)	大阪大學	分離 mono-adducts、malonic acid 與酯化反應
9/6 (三)	大阪大學	malonic acid 酯化反應 workup，產率 12%。
9/7 (四)	大阪大學	Bingel-Hirsch reaction with dibromo malonate

9/8 (五)	大阪大學	tritosylation of diethylene triamine
9/9 (六)	大阪大學	旁聽實驗室文獻報告
9/11 (一)	大阪大學	旁聽實驗室工作報告、 Bingel-Hirsch reaction (hexakis-adducts)、 Polyhydroxylation of C60
9/12 (二)	大阪大學	Workup: polyhydroxylation of C60
9/13 (三)	大阪大學	workup: Bingel-Hirsch reaction (hexakis-adducts)
9/14 (四)	大阪大學	Bingel-Hirsch reaction (multiple adducts turn into hexakis-adducts)
9/15 (五)	大阪大學	旁聽實驗室工作報告、 workup: Bingel-Hirsch reaction (multiple adducts turn into hexakis-adducts)
9/16 (六)	大阪大學	旁聽實驗室文獻報告
9/18 (一)	大阪大學	敬老節
9/19 (二)	大阪大學	alkylation of dibromo malonate、Bingel-Hirsch reaction with dibromo malonate
9/20 (三)	大阪大學	Prato reaction
9/21 (四)	大阪大學	Workup:Prato reaction
9/22 (五)	大阪大學	質譜鑑定水溶性富勒烯產 物、hexakis-adducts、Prato reaction crude
9/23 (六)	大阪大學	秋分節
9/24 (日)	大阪-關西機場-台北	前往關西機場，搭乘長榮航 空(BR 177)回台。

1. 2017 年 8 月 25 日：

搭乘長榮航空(BR 178 班次) 06:30，由台灣桃園國際機場出發，上午 10:10 抵達日本關西國際機場，搭乘 Limousine 巴士至大阪機場，轉乘大阪單軌電車抵達阪大醫院前站。步行前往大阪大學工學院應用化學所櫻井教授實驗室，取得實驗室鑰匙及工學院系館門禁卡。隨後至國際交流會館吹田分館(International House, Suita) check-in，晚上七點前往實驗室與櫻井教授打招呼。

2. 2017 年 8 月 26 日-9 月 23 日：

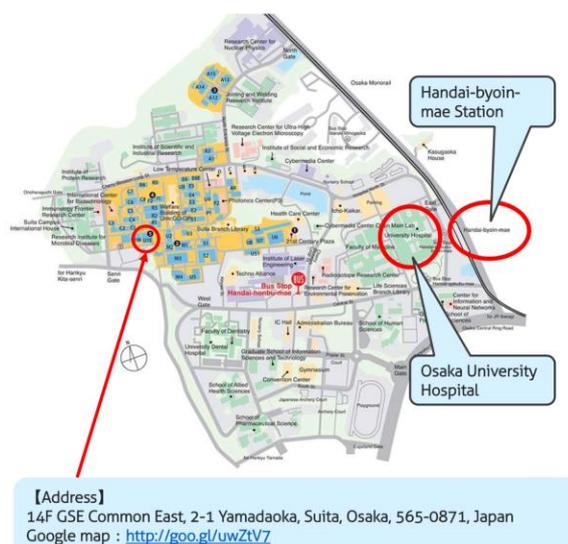
與助理教授伊熊直彦(IKUMA NAOHIKO)初步討論後，由碩二學生應矢彰伸(OYA AKINOBU)帶領認識實驗室環境及規則，開始進行實驗。實習內容包含 Bingel-Hirsch 反應操作、富勒烯單一加成產物(C60-monoadducts)製備、富勒烯六次加成產物(C60-hexakisadducts)試做、含溴丙二酸酯製備、水溶性富勒烯(fullerenol)試做、Prato 反應操作及各項反應粗產物的分離、光譜、質譜鑑定。

3. 2017 年 9 月 24 日：

搭乘長榮航空(BR 177 班次) 11:30 回台。

(二) 實習單位簡介

大阪大學於 1931 年創校，簡稱阪大，是當時日本第六所帝國大學，學脈可追溯至江戶時代的懷德堂(漢學堂，起源於 1724 年)及適塾(蘭學堂，起源於 1838 年)。阪大屬於研究型綜合大學，學生人數約 23400 人，教職員工約 3465 人。其中外國留學生約 2000 人，將近八成來自亞洲各國，其次則是歐洲。校園主要分三個區塊，豐中校區(Toyonaka campus)、吹田校區(Suita campus)、箕面校區(Minoh campus)。本次實習地點櫻井英博實驗室位於吹田校區，如圖一所示：



圖一、實習地點位置圖

櫻井英博教授為東大理學博士(1994年)，經歷為大阪大學講師/副教授(2000-2004年)、分子科學研究所副教授(2004-2014年)，大阪大學教授(2014-至今)。專長有機化學。研究方向為物理有機化學，研究主題包含 buckybowl 分子碗，主要是花烯(sumanene)衍生物合成、物性與應用、金屬奈米團簇(nano cluster)觸媒開發及富勒烯化學。研究團隊中另外兩位教授，分別是副教授燒山佑美(YAKIYAMA YUMI)，專長超分子錯體化學、無機化學、構造有機化學；助理教授伊熊直彥，專長物理化學(分子軌道計算)、合成化學、奈米材料化學。學生人數將近 20 人，以碩士生為主力。實驗室外觀照片如圖二：

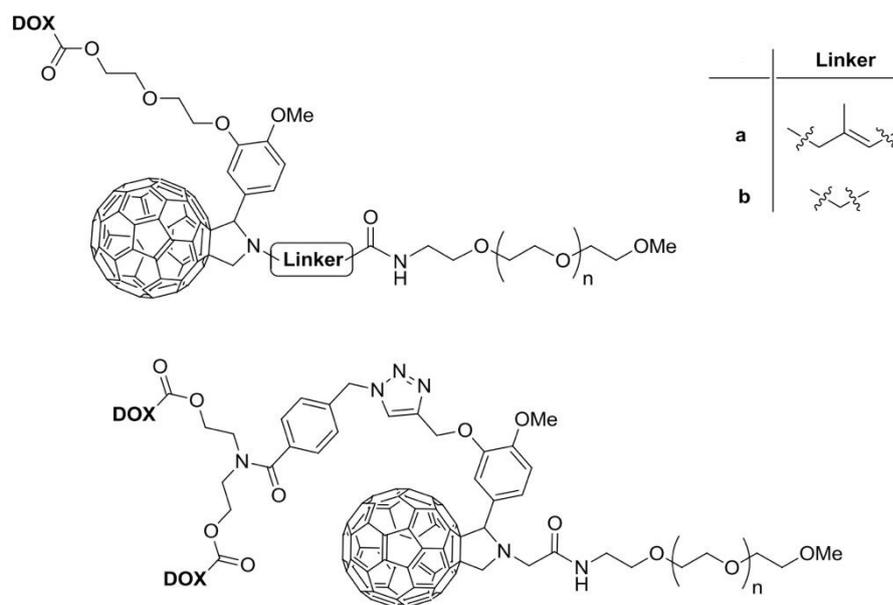


圖二、實驗室外觀

(三) 實習內容摘要說明

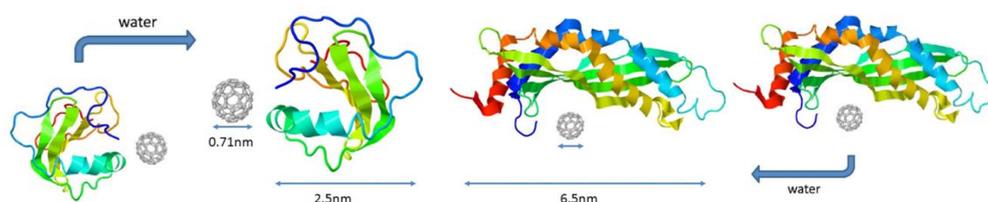
1. 富勒烯藥物耦合物及富勒烯藥物輸送相關文獻

富勒烯-抗癌藥物阿霉素(Doxorubicin)衍生物¹，在富勒烯上修飾一或兩個阿霉素，中間 linker 選用 PEG，結構如圖三，以 MCF-7 細胞做內化試驗，單純的阿霉素約 15 分鐘可觀察到被細胞吸收，而 DOX-C60-PEG 需要較長時間才被吸收，大約 48 小時，跟單純的阿霉素作用相比，DOX-C60-PEG 具有 antiproliferative activity 的可能性。



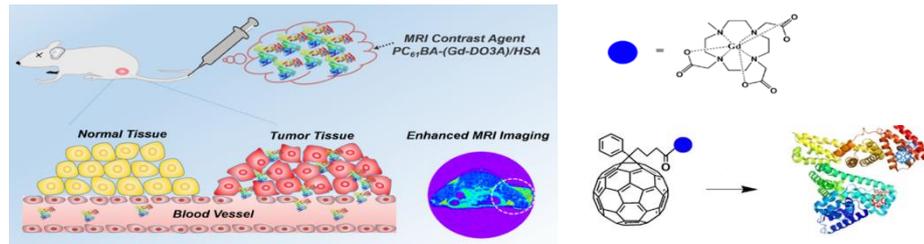
圖三、DOX-C60-PEG¹

由於富勒烯不溶於水，所以多數修飾成衍生物時是使用增加水溶性的 PEG。除了直接在殼外修飾親水官能基外，另一種作法是利用富勒烯的疏水性與蛋白質的疏水空穴來做吸附，使得複合物可溶於水，帶入細胞內。例如使用 latherin 和 ranaspumin-2 兩種蛋白質可提升富勒烯水溶穩定性²，使複合物當做奈米粒子來做使用。(圖四)



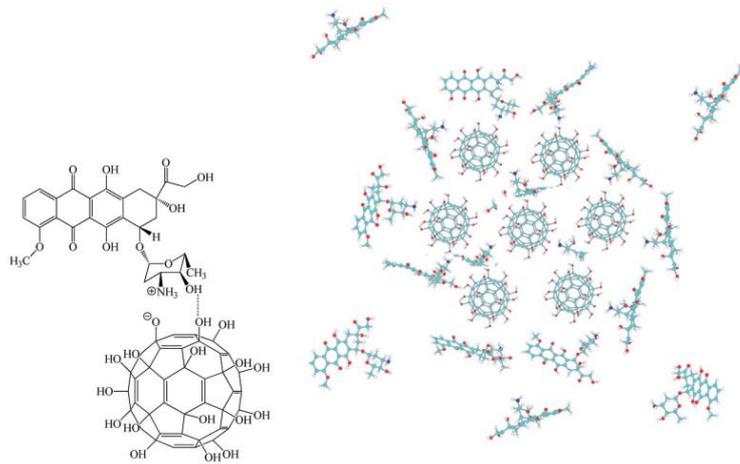
圖四、富勒烯蛋白質複合物²

這種直接利用疏水性吸附的方式同樣也適用殼外修飾過的富勒烯，將 DOTA 接上富勒烯後，與鈣配位再和人類血清蛋白複合，即可做為 NMR 對比劑³。(圖五)



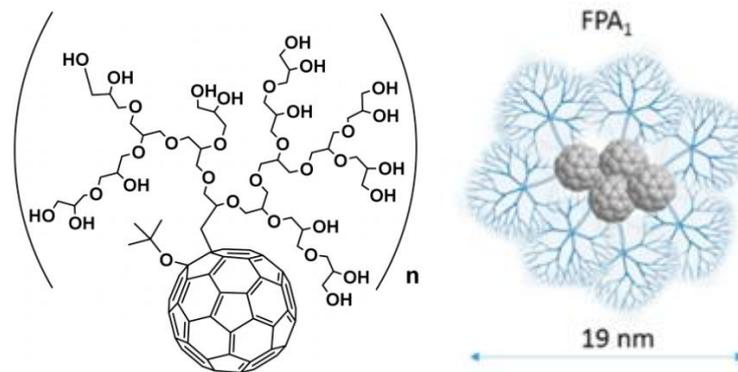
圖五、富勒烯 Gd-DO3A 蛋白質複合物³

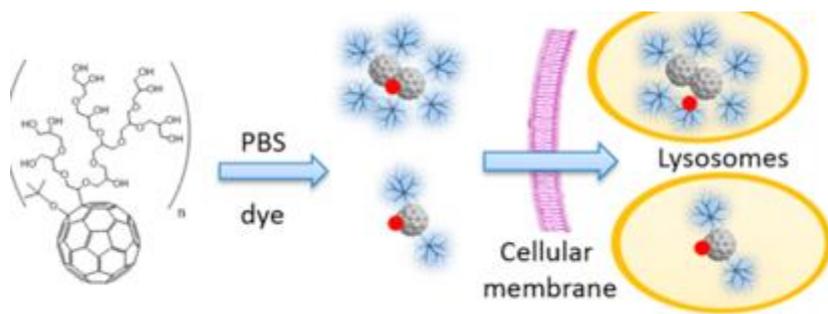
富勒烯與阿霉素的組合，除了殼外直接鍵結、疏水複合外，透過經基化水溶性富勒烯(富勒醇，fullerenol)在水中自然形成 nano-aggregates 時的氫鍵作用或吸附，也可和阿霉素形成非共價複合物⁴，使富勒醇可做為輸送阿霉素的媒介，報導中的光譜資料僅有氫譜位移變化，沒有提供 DOSY 之類的觀察數據。圖六的非共價鍵結情形，是綜合光譜、AFM、TEM 所做的推測。



圖六、富勒烯 Gd-DO3A 蛋白質複合物⁴

除了利用光譜觀察被吸附藥物或小分子的位移變化(或 DOSY 擴散係數)，利用染料直接看細胞是否吸收變色是更直接的實驗方式來判斷富勒烯衍生物能否做為藥物輸送平台的能力。在富勒烯外殼修飾分支的 PEG，使其成為具有疏水、親水的兩性分子，在水中同樣會聚集成 nano-aggregates⁵，疏水部分吸附小分子或芳香族藥物。(圖七)

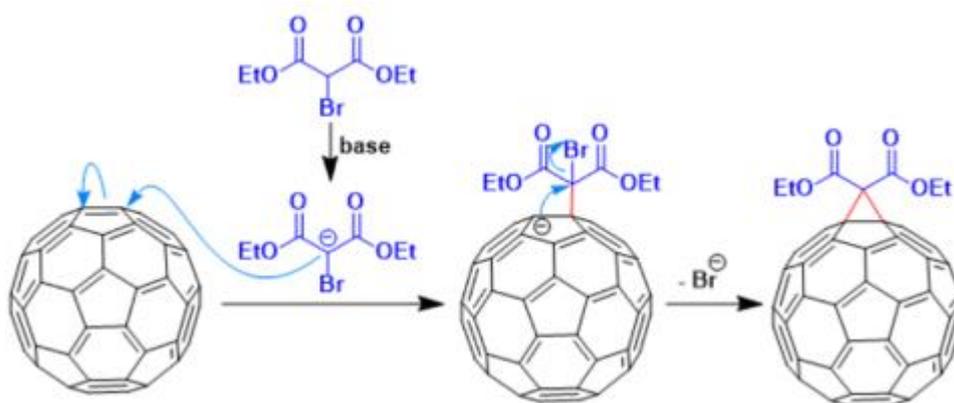




圖六、富勒烯兩性分子做為藥物輸送平台⁵

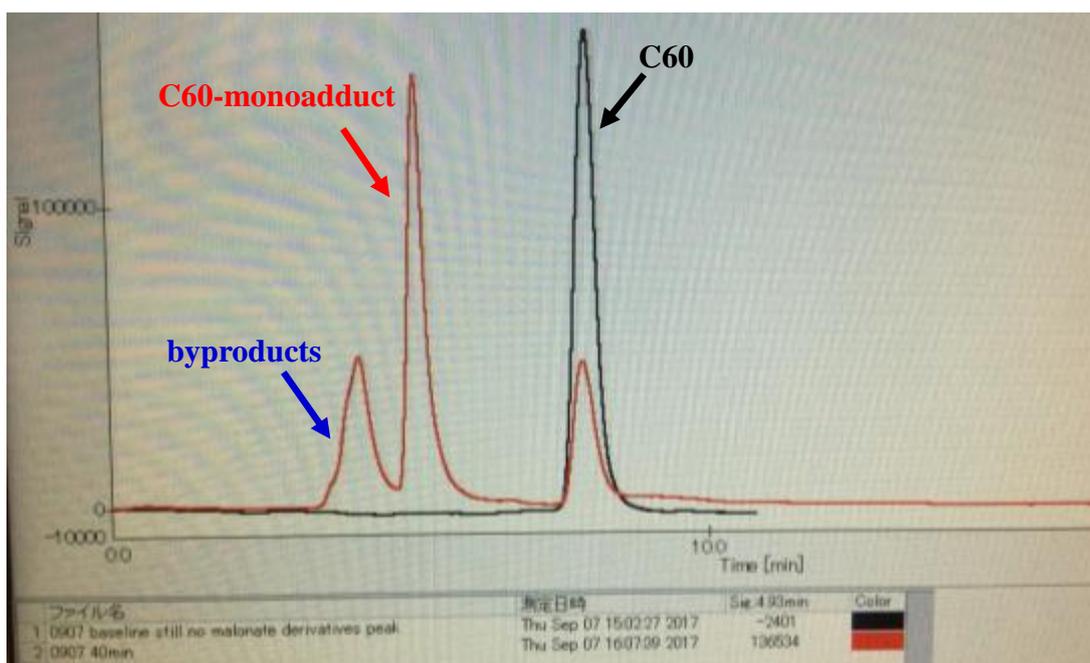
2. Bingel-Hirsch 反應:單一加成產物(C60-monoadducts)

Bingel 反應本質為親核加成反應，反應初期富勒烯外殼上的[6,6]雙鍵被親核試劑加成後，新生成的碳負離子回頭進攻丙二酸酯，形成環丙烷化加成產物。反應機構如下圖:



圖七、Bingel 反應機構⁶

其中鹵化丙二酸酯類通常是反應中即時製備，可以選用不同類型的丙二酸酯類，加入有機鹼如 DBU，鹵化試劑如碘或四溴化碳。在使用四溴化碳的場合，鹵化速度較慢，所以與富勒烯反應的時間拉長，因此常需反應數天(由加成數目而定);使用碘的場合，反應極快，基本上是一加入 DBU 移除丙二酸酯的 α -氫，立刻有加成產物生成。通常使用 HPLC 追蹤富勒烯反應情形，常用的分析管柱規格為 Buckyprep，動相為甲苯，流速 1mL/min。層析情況如圖八:

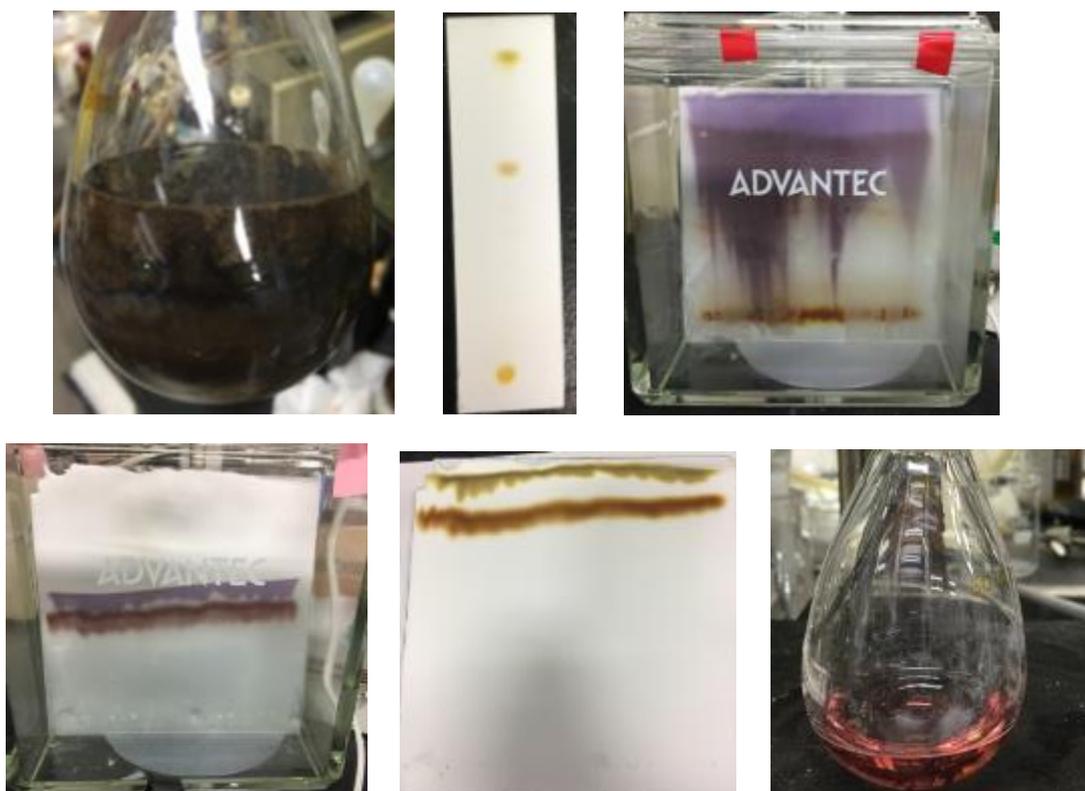


圖八、HPLC 追蹤 Bingel 反應

富勒烯的滯留時間約 8 分鐘，單一加成產物的滯留時間小於富勒烯，接近丙二酸酯。隨著反應進行，副產物也會生成，停止反應的條件通常是產物不再明顯增加或是副產物愈來愈明顯。因此會有未反應完的富勒烯殘留，產率普遍不高，約 30-50%。另外，富勒烯長時間與空氣接觸易氧化，因此除氧在某些情況下是必要的，而在 Bingel 單一加成的實驗中，不除氧或是僅用氮氣 purge 都可以，但若較長時間的反應建議除氧徹底後，於氮氣下反應。使用最簡單的丙二酸二甲酯來進行 Bingel 反應，熟悉實驗操作。

實驗過程:

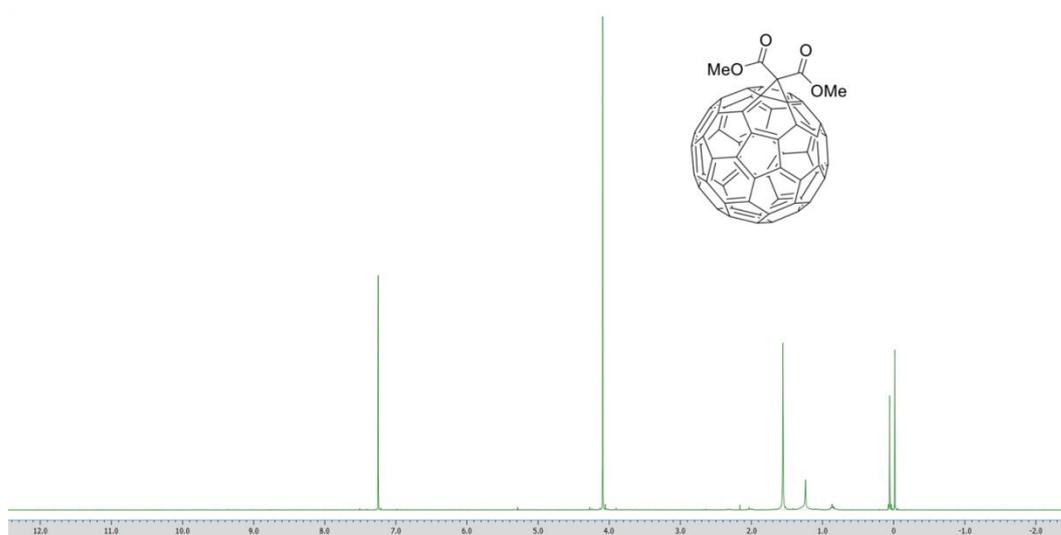
丙二酸二甲酯(1 當量)、富勒烯(1 當量)、碘(1 當量)、DBU(1 當量)及溶劑甲苯。富勒烯在二硫化碳及甲苯中有較佳的溶解度。加料順序不影響反應，但建議 DBU 最後加。反應約 30-40 分鐘，雖然 HPLC 仍可見富勒烯訊號存在，但其他雜質已變多，因此終止反應。在碘的用量少(10~20 毫克)的情況下，不需要特別去 quench。直接蒸發甲苯移除溶劑。點 TLC 片可見到溶劑前緣即是富勒烯，Rf 接近 0.4 處為單一加成產物，底線附近不動的點視為雜質。粗產物的分離，如果是小量操作(富勒烯小於 50 毫克)，可以先過一次短 column，以氯仿為沖提液，讓含碘的部分最後沖出。另一個方案是小量操作時，直接使用製備級 TLC。相關實驗照片如圖九所示:



圖九、C60-monoadducts 粗產物進行兩次 PTLC 分離

光譜測量:

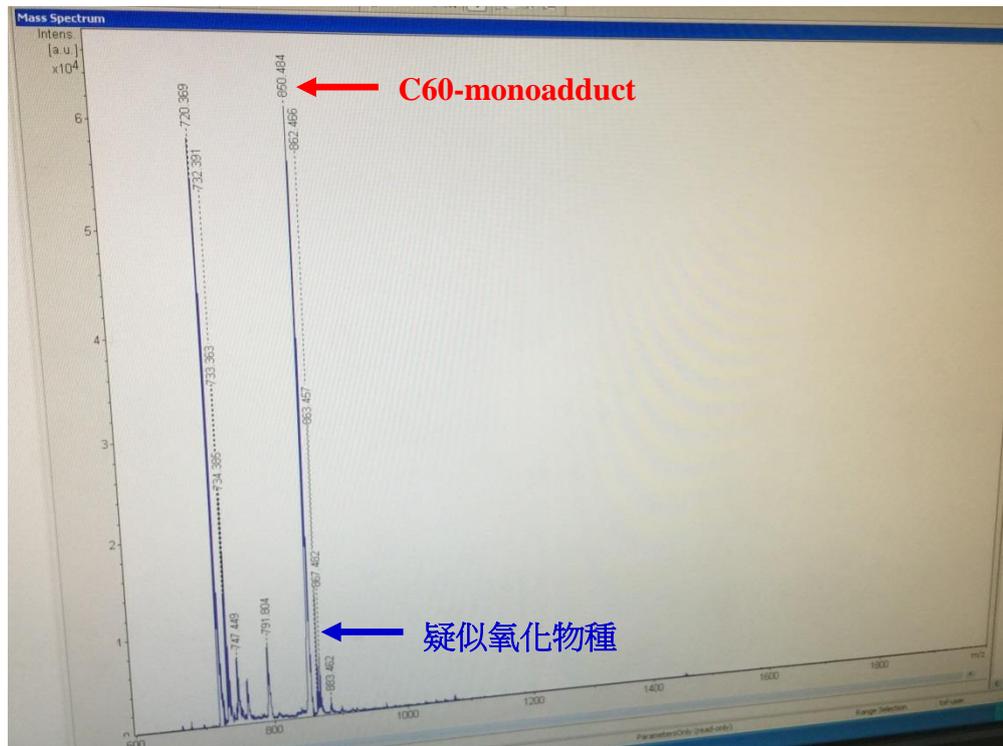
分離後得到產物約 5 毫克，產率約 7%，以 Bingel 反應來講算是偏低。進行光譜及質譜確認。大阪大學的 NMR 基本上是各教授實驗室的自有儀器，通常是 400MHz 或 500MHz，讓學生方便使用為主。工學院分析中心的 NMR 屬於公用儀器，有兩台 400 MHz，一台 600MHz (Bruker AVANCE III)，另外蛋白質研究所溶液 NMR 尚有 400MHz、500MHz、600MHz、800MHz、950MHz，這些儀器除了校內可申請使用，也有開放校外合作。櫻井實驗室自有的 NMR 為 JEOL 400MHz，操作方式與本所去年新購的 JEOL 500MHz 相同，均為放入樣品，自動勻場、鎖定磁場、測量的模式。



圖十、櫻井實驗室 NMR 及 C60-monoadducts 氫譜

質譜測量:

氫譜只有甲酯訊號，基本是單一加成產物，但仍需確認分子量。停留期間，櫻井實驗室的 APCI-MS 部分組件正好停用，因此改用工學院分析中心的 MALDI-TOF 進行測量。(Bruker Autoflex III)



圖十一、Bruker Autoflex III 及 C60-monoadducts 質譜

由質譜觀察到，有單一加成產物的質量及可能是氧化物種的訊號，另外也看到富勒烯的質量，這可能是來自於加成產物的碎裂(fragmentation)。

3. Bingel-Hirsch 反應:六次加成產物試驗(C60-hexakisadducts)

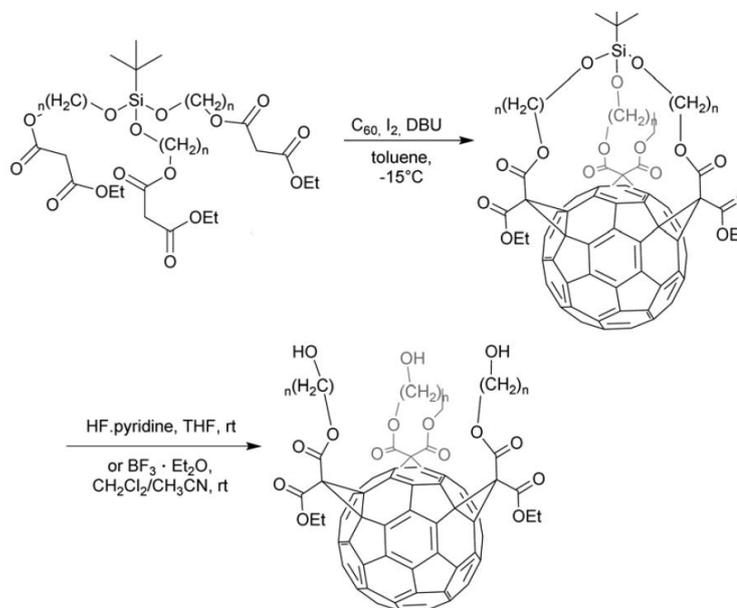
實際操作過 Bingel 反應後，開始進行多次加成試驗，想要在富勒烯外殼修飾上各種官能基或金屬配基，可以透過多次加成來逐步修飾富勒烯的外殼。但主要困擾是，每一次的加成都會改變富勒烯的對稱性，形成位置異構物，在分離及光譜鑑定上增添不少麻煩。因此具有位置選擇性的加成反應或是可維持對稱性的加成條件是進行殼外修飾的主要方法。各種加成產物與對稱性關係如圖十二所示：

Examples for substitution patterns of fullerenes

Substitution	Symmetry	Space-group
Bis	I_h, C_1, C_2, C_s	$P\bar{1}$
Tris	C_2, C_{2v}	
Tetrakis	D_{2h}, C_{2v}	$P\bar{1}$
Pentakis	C_{2v}, C_s, C_5, C_{5v}	
Hexakis	D_2, T_h, T	$C2$
Decakis	D_{5h}	

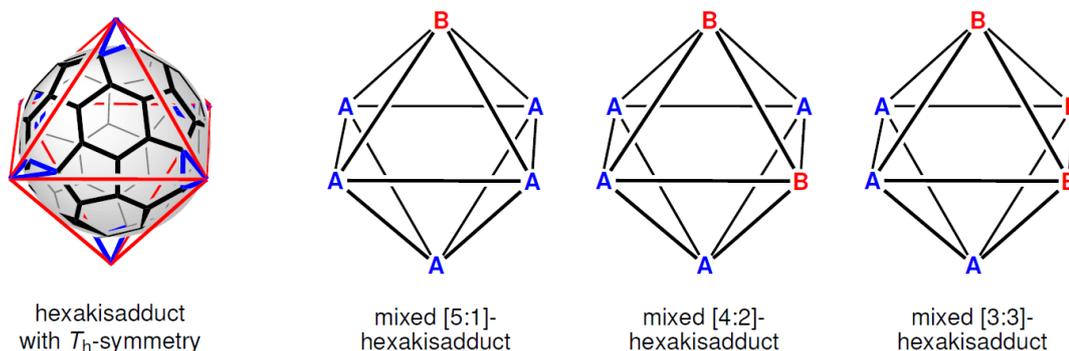
圖十二、富勒烯加成產物與對稱性⁷

圖十二表示的對稱性並非全部都可在實驗中觀察到，只是理論會形成的對稱性。在 Bingel 條件下，可以得到結構對稱的六次加成產物(T_h)或三次加成產物。原先三次加成產物在使用對稱的丙二酸酯類與富勒烯反應後，會產生多種位置異構物，但若使用 tris-malonate，可得到單一結構的 C_{60} -e,e,e-tris-adducts⁷，如圖十三。



圖十三、 C_{60} -e,e,e-tris-adducts⁷

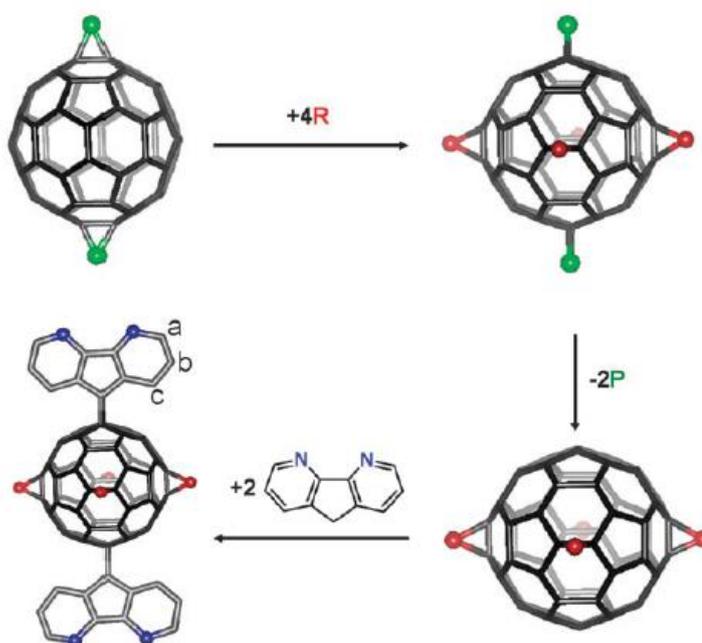
而六次加成產物，可以是過量的丙二酸酯做 6 次加成[6:0]，或是以 C_{60} -monoadducts 為起始物再以別種丙二酸酯做後續的 5 次加成[5:1]。(圖十四)



T_h symmetrical hexakisaddition and examples for mixed hexakisadducts.

圖十四、富勒烯六次加成產物⁸

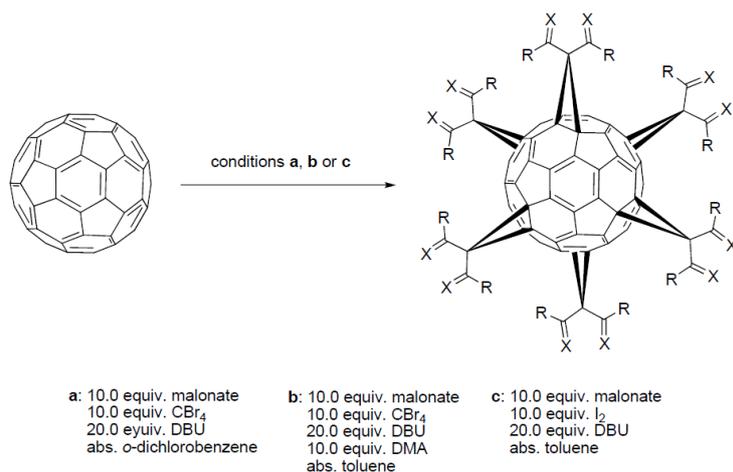
其中[3:3]的加成產物，可利用前述的 tris-malonate，先在富勒烯的一面形成 e,e,e-tris-adducts，然後再用 tris-malonate 進行一次 Bingel 反應把另一面的反應位置也填滿。而[4:2]的加成產物，則需要先有位置確定的 bis-adduct，再和 malonate 做剩餘 4 次的加成反應。



圖十五、富勒烯[4:2]六次加成產物⁹

要產生圖十五的起始物 trans-1 bis-adducts，通常策略是以 anthracene 和富勒烯進行 Diels-Alder 反應後得到保護的 bis-adducts，再與 malonate 進行 Bingel 反應，做完 4 次加成。之後在 200°C 下，脫去 anthracene，露出的[6,6]雙鍵位置，可再進行反應，得到富勒烯[4:2]六次加成產物。

停留期間，我們使用簡單的例子來瞭解多次加成的操作，製備上，[6:0]、[5:1]及[3:3]的六次加成產物比[4:2]來得簡易。一旦我們熟悉了[6:0]，換一個丙二酸酯就可做到[5:1]，而[3:3]則需要先做出 tris-malonate。因此，使用最簡單的丙二酸二甲酯來進行 Bingel 反應。六次加成的反應條件，參考德國 KIT(Karlsruher Institut für Technologie) Stefan Bräse 教授的報告¹⁰，有三種常用的方式。由於使用四溴化碳進行多次加成反應，文獻上所報導的反應時間常常大於一週，對於短期停留的實習不是很適合，且使用溶劑是高沸點 (180.5 °C)的鄰二氯苯(ODCB)，之後還需要移除大量溶劑。因此，我們仍使用碘作為鹵化試劑，於甲苯中進行反應。



Synthesis protocols for the sixfold Bingel reaction by Sun (a) , Hirsch (b) and Bräse (c).

圖十六、富勒烯六次加成反應條件¹⁰

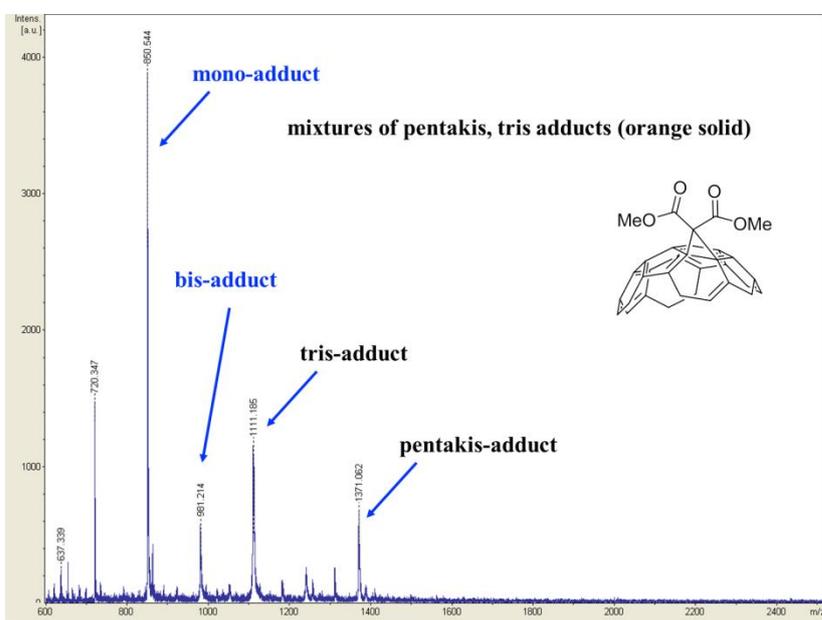
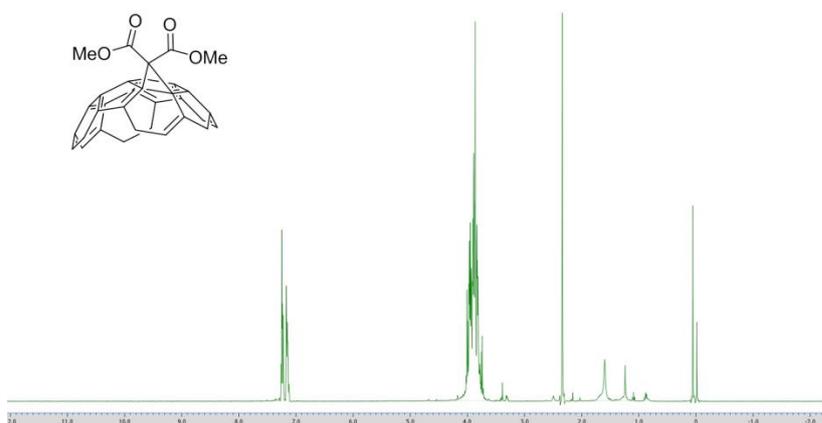
實驗過程:

丙二酸二甲酯(10 當量)、富勒烯(1 當量)、碘(10 當量)、DBU(20 當量)及溶劑甲苯。在尚未加入 DBU 前，先除氧，freeze-pump-thaw 進行三次後，加入 DBU。室溫氮氣下反應 14 小時後終止。後處理先以硫代硫酸鈉 quench 過量的碘，萃取數次後，濃縮，過一短管柱，以氯仿沖提，儘量移除不溶氯仿的物質。得到的分液為橘-棕色，分三次收集，但由氫譜得知，以氯仿沖提出來的大多是相同的混合物。因此，以 PTLC 進行分離，跑片條件為乙酸乙酯/甲苯=1:10。可分出三個帶，最下面是橘-棕色、中間是棕色、上層顏色較淡，但溶液時有點接近粉紅色。

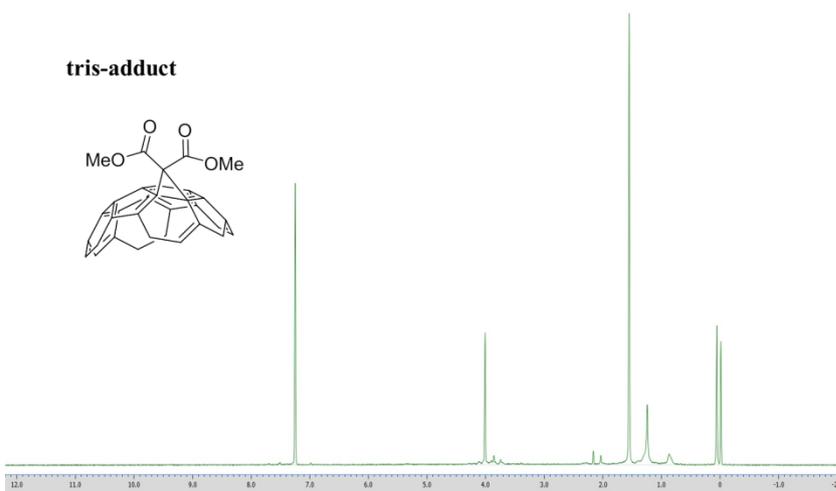
光譜、質譜測量:

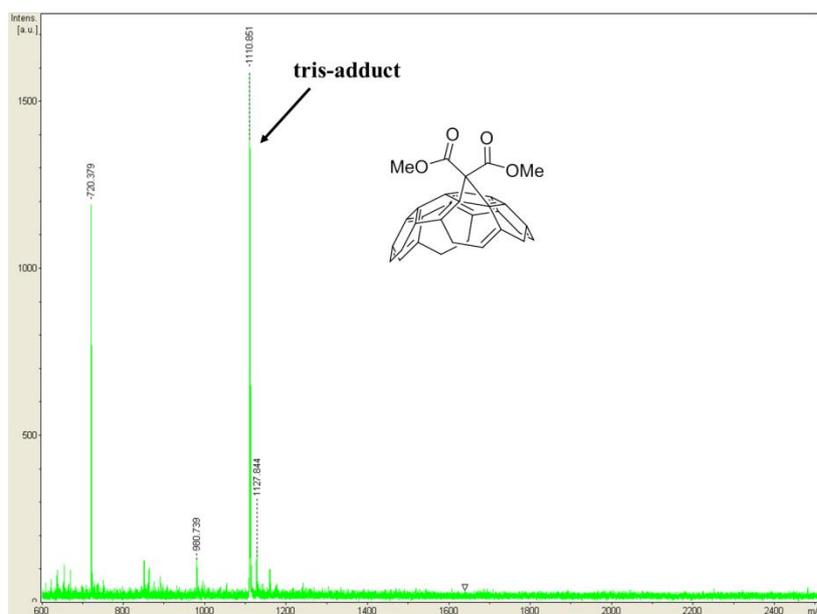
將分離產物逐一測量質譜，發現橘-棕色部分主要為五次加成的混合物、棕色部分為四次加成的混合物及三次加成產物。未觀察到六次加成產物；三次加成產物氫譜較為乾淨，嘗試測碳譜，想觀察看看是否可以得知加成產物的位置異構物分佈情形，但因濃度過稀，未能得到有代表性的訊號。

**mixtures of pentakis, tris adducts
(orange solid)**



tris-adduct





圖十七、富勒烯多次加成反應粗產物氬譜、質譜

重新檢討後的方案:因先前已嘗試過 100 當量的碘條件，反應雖快，但也無六次加成產物，因此維持各試劑當量比，僅延長反應時間；並將回收的五次加成產物混合物重新進行 Bingel 反應，觀察是否能繼續進行到六次加成。

調整反應條件(延長反應時間):

丙二酸二甲酯(10 當量)、富勒烯(1 當量)、碘(10 當量)、DBU(20 當量)及溶劑甲苯。在尚未加入 DBU 前，先除氧，freeze-pump-thaw 進行三次後，加入 DBU。室溫氮氣下反應約 40 小時後終止。粗產物為橘紅色溶液，後處理同樣先 quench 過量的碘、短管柱沖提、PTLC 初步分離。跑完 PTLC 後大致有三個帶，最下方為橘紅色，分別收集測量光譜、質譜。發現最下方橘紅色部分有六次加成產物訊號，但質譜訊號較雜，氬譜訊號也沒有很乾淨，因此，回收此部分，改以製備級 HPLC 分離，看看是否有較佳的結果。

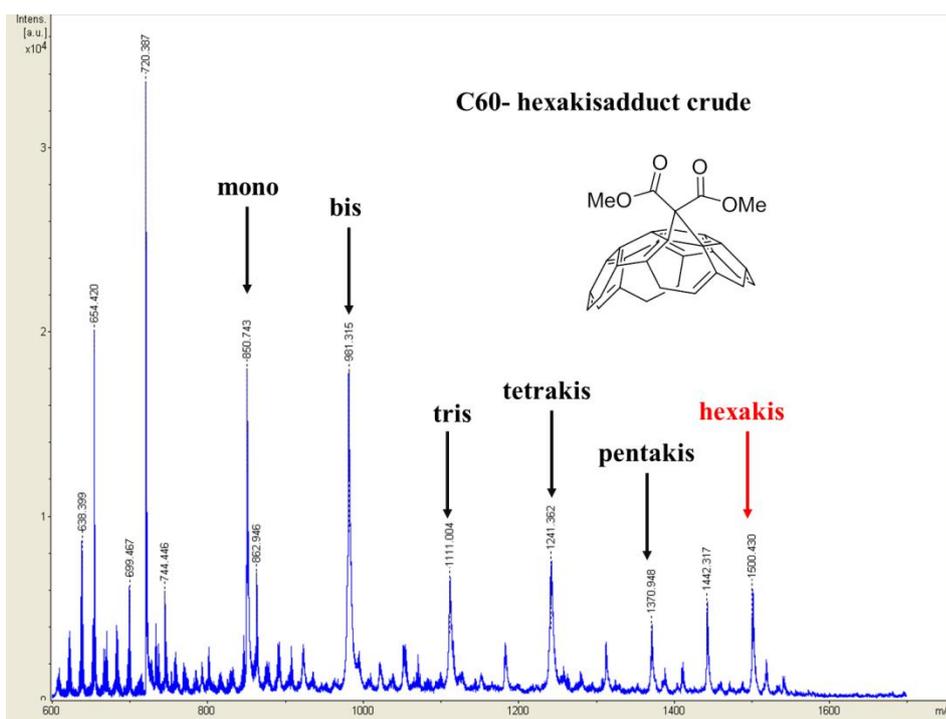
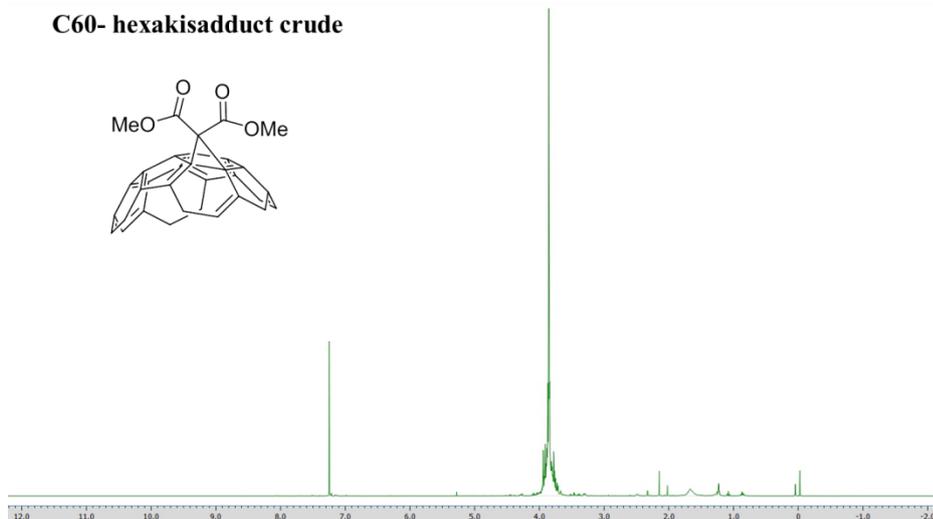


圖十八、富勒烯六次加成反應粗產物 PTLC

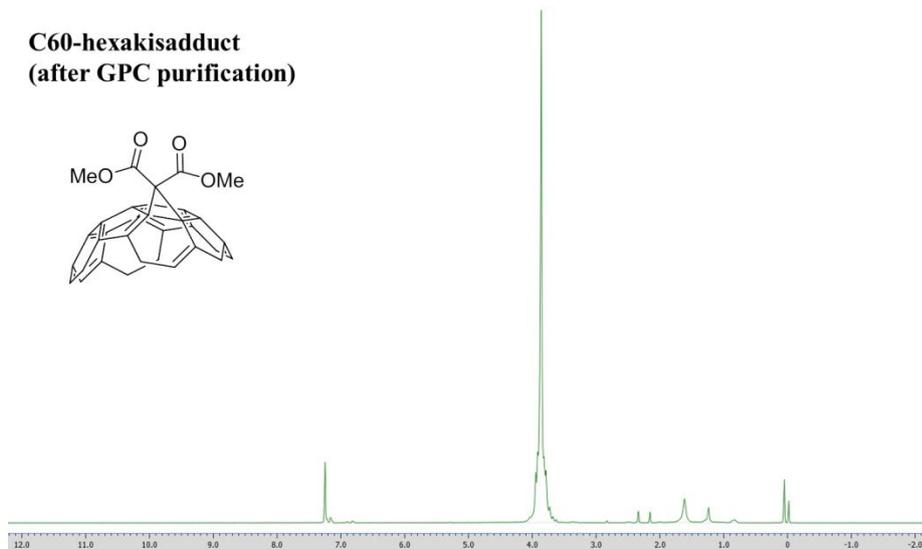
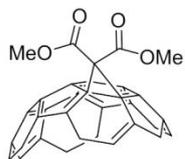
光譜、質譜測量:

以 HPLC 分離後，氫譜的甲酯旁邊較無雜訊，質譜結果比先前來得清楚，如果能有碳譜訊號佐證對稱性的碳數更佳，但因東西量少，且不方便連續幾天 overnight 測量，因此未測碳譜，但根據質譜、氫譜，可認為有得到六次加成產物(C60-hexakis adducts)。

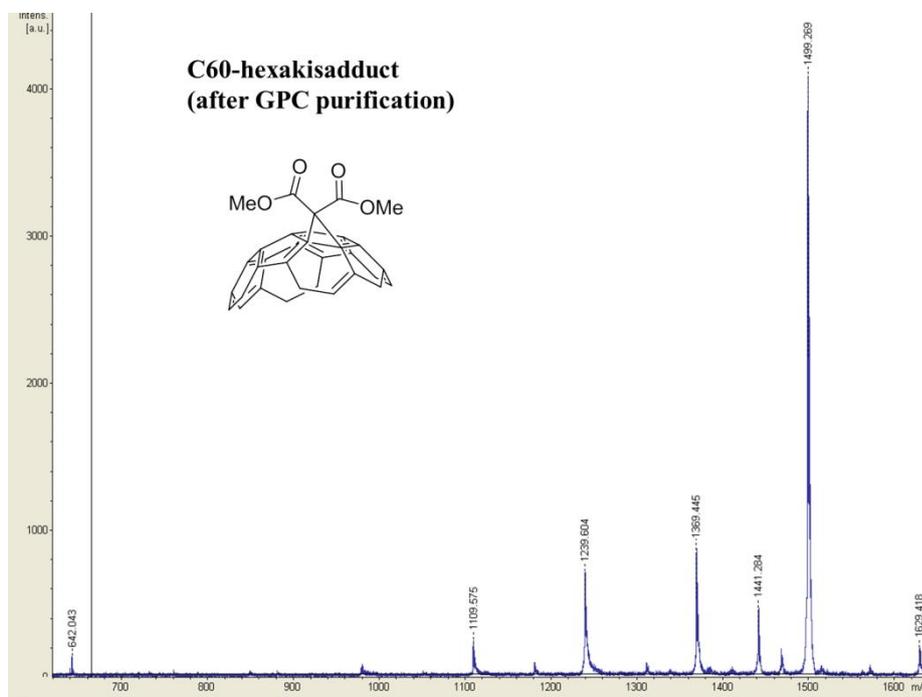
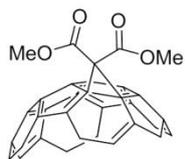
C60- hexakisadduct crude



**C60-hexakisadduct
(after GPC purification)**



**C60-hexakisadduct
(after GPC purification)**



圖十九、富勒烯六次加成產物 GPC 純化前後氫譜、質譜



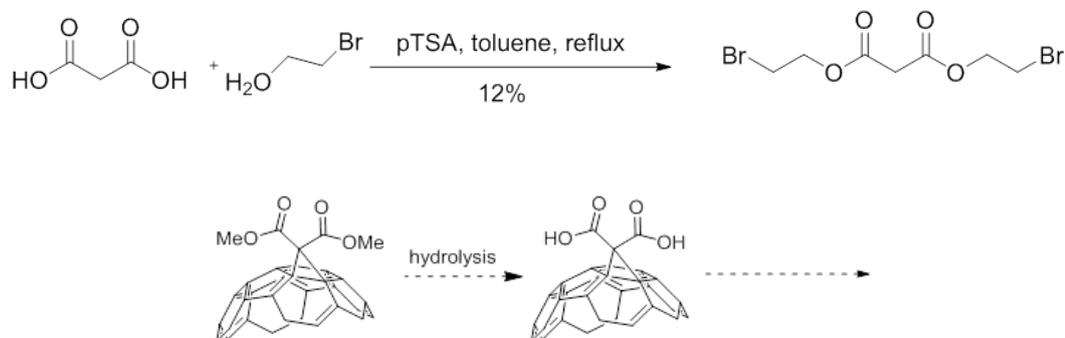
圖二十、櫻井實驗室循環製備級 HPLC 及管柱

調整反應條件(使用回收的多次加成產物繼續反應):

使用回收的五次加成產物混合物重新進行 Bingel 反應，觀察是否能繼續進行到六次加成。出乎意料的是，反應終止後，得到的粗產物即使以純乙酸乙酯跑片，幾乎是在原點不動，氬譜顯示像是有加成產物，但質譜卻未觀察到六次加成產物。

4. Bingel-Hirsch 反應:單一加成試驗(使用含溴丙二酸酯)

熟悉單一加成、六次加成條件後，使用不同的丙二酸酯類，來做後續可以應用的衍生化。對稱的丙二酸酯可以由丙二酸經酯化製備，我們先製備含溴丙二酸酯¹¹，預期可和富勒烯進行 Bingel 反應，後續可再用簡單的親核反應取代掉溴，達到衍生化的目的。另外，也可以水解掉簡單的富勒烯酯類加成產物，進行別的反应。



圖二十一、單一加成產物後續衍生化

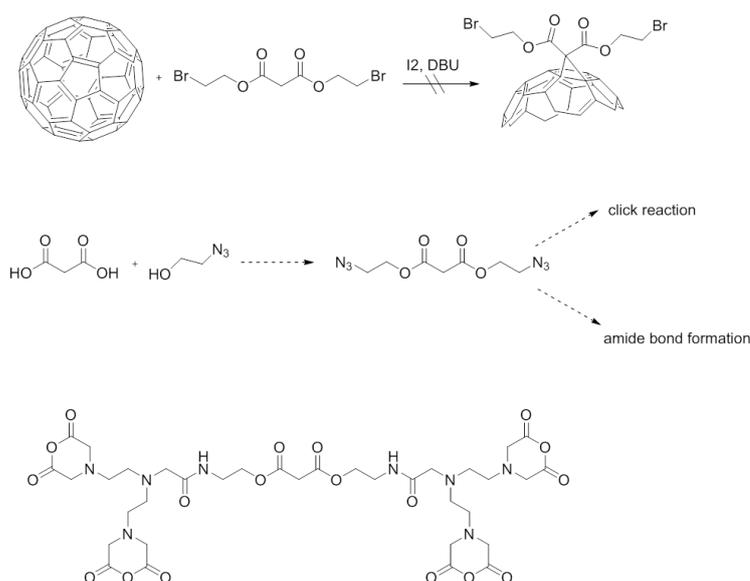
丙二酸酯製備過程:

丙二酸、2-溴乙醇、pTSA 溶於甲苯中，配合 Dean-Stark apparatus 迴流 17 小時。萃取數次，得黃色油狀粗產物。270 毫克，產率 12%。

單一加成 Bingel 反應(使用含溴丙二酸酯):

含溴丙二酸酯(1 當量)、富勒烯(1 當量)、碘(1 當量)、DBU(1 當量)及溶劑甲苯。氮氣 purge 反應約 30-40 分鐘，HPLC 可見富勒烯訊號存在及疑似單一加成產物訊號。終止反應。移除溶劑、過短管柱、PTLC 初步分離。但粗產物氫譜沒單一加成產物的跡象，質譜也無預期分子量出現。重新再做一次，freeze-pump-thaw 除氧。反應中，HPLC 同樣有出現疑似單一加成產物 peak。反應一小時後終止，TLC 可見殘餘富勒烯存在，但無明顯單一加成產物的點(通常會有顏色)，處理後，無預期加成產物存在。

此步失敗原因不明，兩次實驗過程 HPLC 層析圖相似，均顯示在滯留時間小於 8 分鐘，有新產物出現，但兩次 workup 狀況不同，都無法回收到此疑似單一加成產物。討論後，含溴丙二酸酯，可以改為疊氮丙二酸酯，同樣可以做後續衍生，使用 click reaction 或 Staudinger ligation。例如先做成含 DTPA 的丙二酸酯類，如下圖所示:

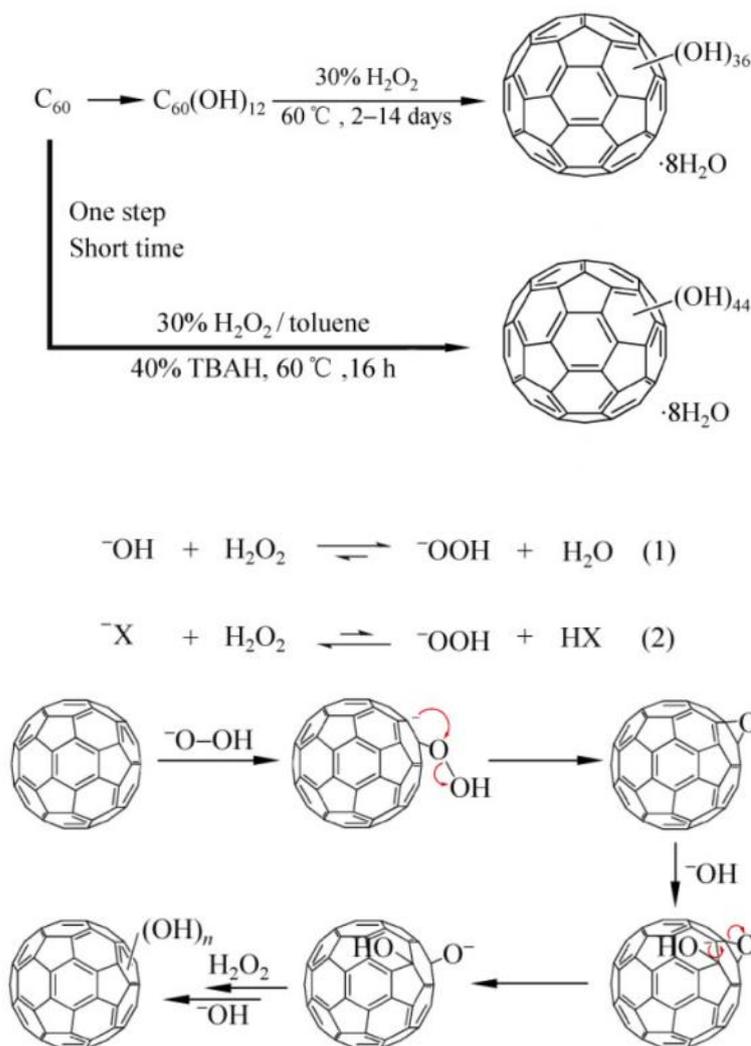


圖二十二、含溴丙二酸酯 Bingel 反應失敗

5.水溶性富勒烯製備 (fullerenol, 富勒醇)

富勒烯衍生物若要使用在生醫相關方面，必須要提高對水溶解度，一般是引入親水基團，或是將富勒烯表面做成羥基。櫻井實驗室的小久保教授先前有報導過一簡便的水溶性富勒烯製備流程，因此我們按照原始文獻¹²練習將富勒烯羥基化。但是羥基化富勒烯不是 well-defined 結構，表面的羥基數目、位置無法控制，只能推估平均數量。依照小久保的方法最多可以做到平均 44 個羥基。

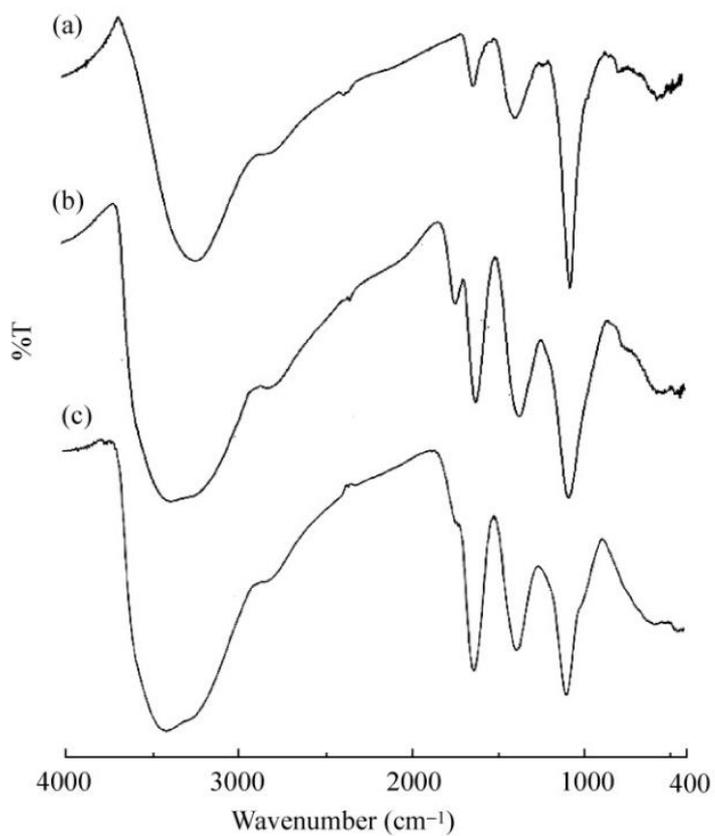
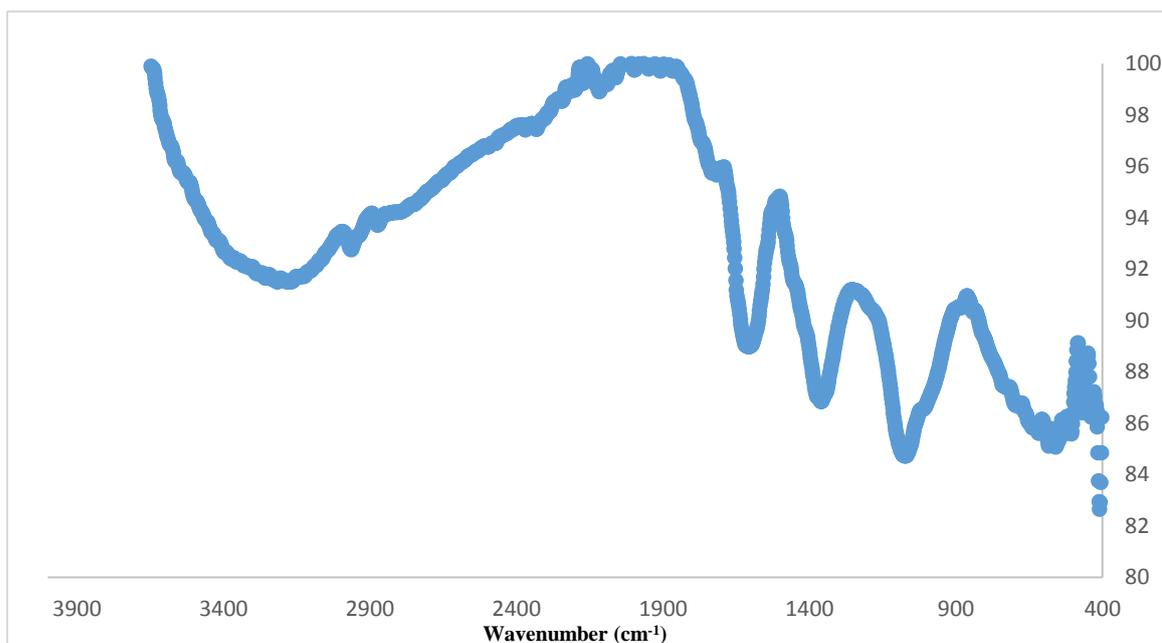
實驗條件及推測的反應機構如下圖所示:



圖二十三、富勒烯羥基化反應及可能的機構¹²

實驗過程及結果:

富勒烯(50 毫克)、30% 過氧化氫水溶液(5 毫升)、40% TBAH 水溶液(0.5 毫升)、甲苯置於 chemstation 試管，60°C 反應 16 小時。起初溶液分層，隨著反應進行，水層逐漸變黃，有機層顏色漸淡。最終有機層完全無色，水層為黃色。反應終止後，萃取收集水層，加入不良溶劑(異丙醇:乙醚:正己烷=7:5:5，體積比)逼出沉澱。離心，轉速 7500 rpm，15 分鐘，可見底部有黃色沉澱析出。以乙醚清洗數次，真空 60°C 乾燥後，測量 IR。粗產物 IR 在 1080、1370 及 1620 cm^{-1} 處可見富勒醇特徵吸收。與文獻比對，知道富勒烯表面有接上羥基。嘗試以 MALDI 質譜觀察分子量，但無法看到羥基化富勒烯訊號，小久保當年的解釋是在離子化過程中，富勒醇是不安定的，因此在 APCI、FAB、MALDI 質譜下均無好的觀測結果。富勒醇粗產物及文獻 IR 如下圖所示:



IR spectra of (a) $C_{60}(OH)_{12}$, (b) $C_{60}(OH)_{36} \cdot 8H_2O$, and (c) purified $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$

圖二十四、富勒醇粗產物 IR 及文獻 IR¹²

chemstation 是東京理化器械公司販售的有機合成裝置，由於櫻井實驗室除了分子碗的研究，還有一部份成員是在做催化主題，所以常使用這種裝置來做平行實驗。

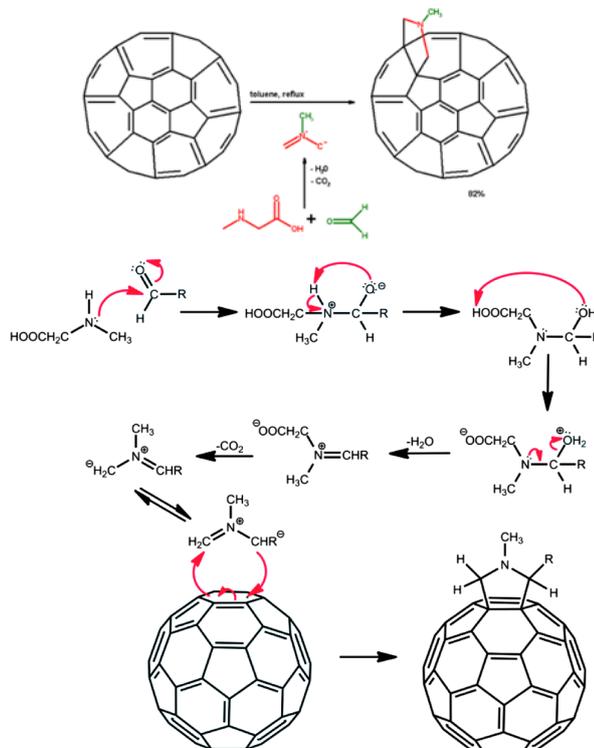
由下圖可見，反應後，水層為黃色的富勒醇衍生物，甲苯層幾乎無色。



圖二十五、櫻井實驗室 chemstation(左)、反應顏色(中)、萃取後富勒醇顏色(右)

6.Prato 反應：單一加成試驗

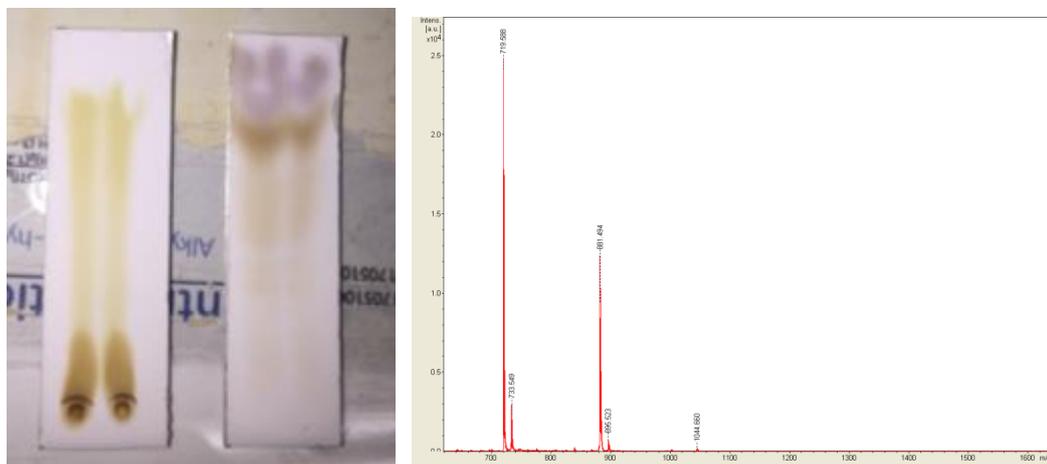
除了利用 Bingel 反應來修飾富勒烯外殼，其他常見的親核反應還有 Grignard 試劑或有機鋰做為親核劑把烷基加成到富勒烯表面上的碗烯(corannulene)區域，形成 5 次加成產物；以及 Prato 反應。Prato 反應本質上是 1,3-偶極環加成反應(1,3-dipolar cycloaddition)，以肌氨酸(sarcosine)、甲醛為例，反應機構如下所示^{13,14}：



圖二十六、Prato 反應機構^{13,14}

實驗過程及結果:

富勒烯(1 當量)、茴香醛(1 當量)、肌氨酸(5 當量)、甲苯(50 毫升)迴流反應過夜¹⁵。反應終止後，過濾移除不溶雜質，點片觀察，可發現除了剩餘富勒烯(紫色的點)外，下方有一棕色的新點，類似 Bingel 反應的單一加成產物顏色，質譜觀察有接近的質量，後續可以 PTLC 分離、甲醇沉澱、離心後再以正戊烷沉澱處理。

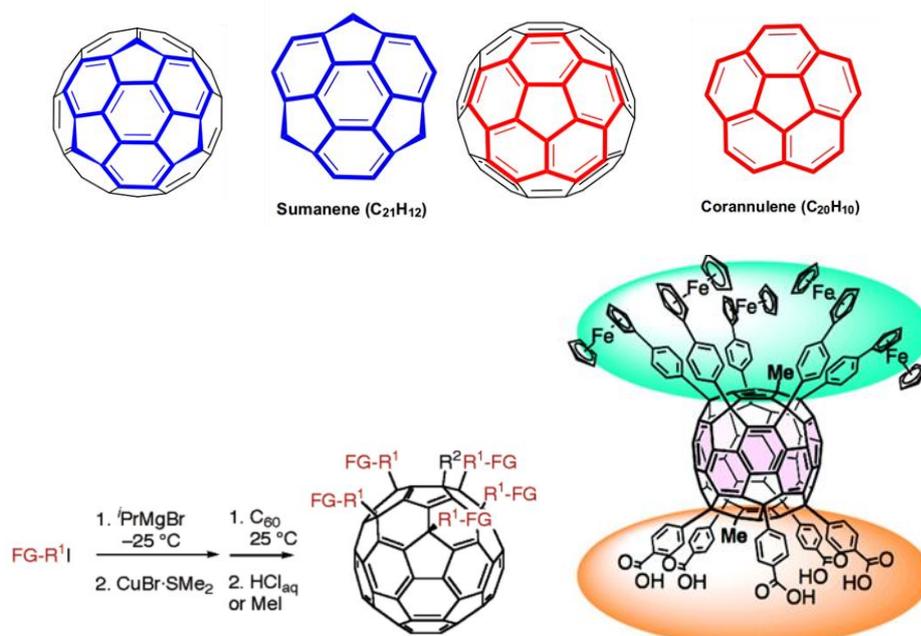


圖二十七、Prato 反應粗產物 TLC、MALDI-TOFMS

三、心得

(一)、前述提到以有機金屬試劑做為親核劑來修飾富勒烯外殼，得到 5 次加成產物。應矢曾以有機鋰試劑反應，除了前置作業繁瑣外(嚴格無水)，但之後就只是攪拌過夜，算是簡單的反應。沒有有機鋰操作經驗的話，可以用文獻提及的 Grignard 試劑，有市售品，但通常建議新鮮配製效果較佳，在有機鋰的例子中因活性高，無須額外加入其他試劑提升反應性。實習剩餘時間無法同時做 Prato 反應和有機鋰實驗，因此最後只嘗試了簡單的 Prato 反應。

(二)、由於用有機金屬試劑的加成位置均在富勒烯的同一面，可看做是全加在碗烯區域，加成上去的官能基可做後續修飾，例如增加親水性或鍵結一些醣類，而另一面沒反應的區域，仍然是相當疏水，因此可以形成兩性的富勒烯衍生物，利用疏水那一面，有機會吸附芳香族藥物，在水溶液夜中形成膠囊之類的結構，當做是攜帶藥物的平台，利用 DOSY 光譜可以協助觀察藥物是否有包覆在內。前述提到的水溶性富勒烯與阿霉素形成非共價複合物的報導，原文僅提供複合後氫譜位移出現變化，然而 DOSY 的觀察結果不顯著，理由是擴散係數相近。因此若是有被包覆，相信在 DOSY 觀察上會比較明顯。另外，由於有機金屬是把烷基加到富勒烯表面上的碗烯區域¹⁶，剩餘的表面應該還存在一個花烯，可以再用 Bingel 反應，最多加成三次，形成[5:3]的八次加成產物。不過搜尋相關文獻，並未發現類似的報導，比較接近的是做兩次有機金屬加成，把富勒烯的兩面碗烯區域反應完，從而得到 10 次加成產物¹⁷。先前提過，加成後的富勒烯性質、反應性會漸漸不同，因為已經不再是球形了，曲面的張力可能影響反應性，自發崩潰成碎片是理論上可能發生的情況。

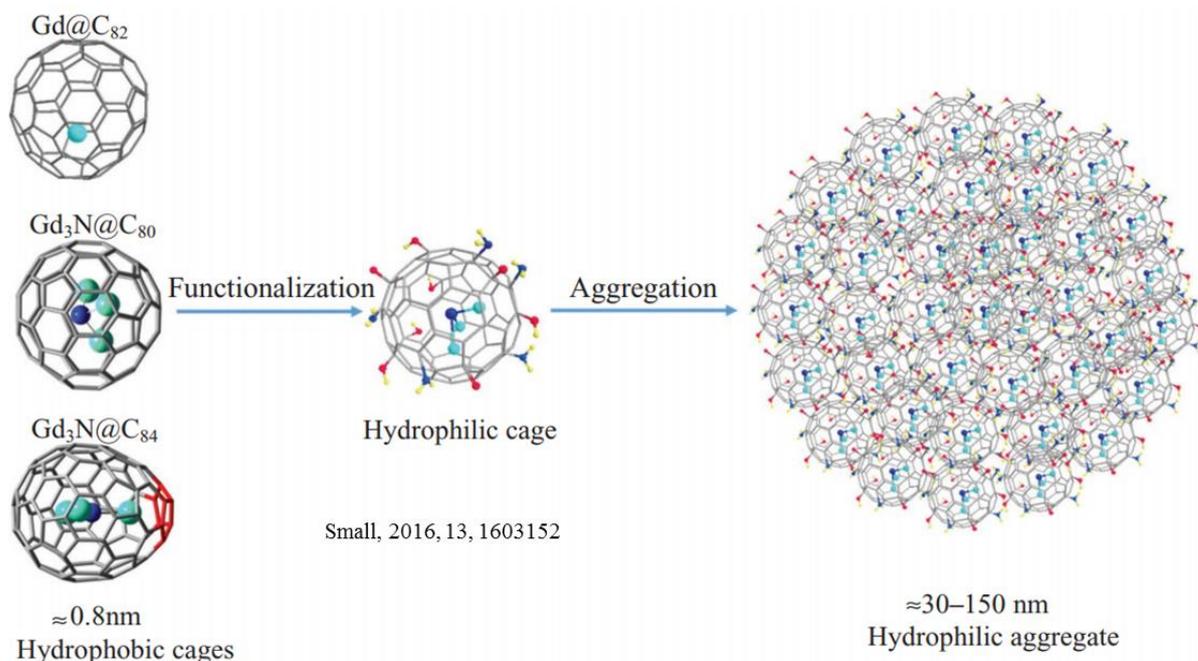


圖二十八、花烯、碗烯區域及 10 次加成產物¹⁷

(三)、關於富勒烯衍生物的水溶性，依然有一些不清楚的問題。例如能否以多次加成產物再進行經基化，特別是六次加成產物，六次加成的位置可以看成是在富勒烯兩面的花烯區域，因此，剩餘區域大概像是一個環狀地帶，仍舊有雙鍵能夠反應。問題是在被侷限的範圍內，反應仍會進行嗎？經基化數目、位置依然隨機？還是會出現選擇性的反應，只在某些位置發生；或者是可以反應，但結構不穩定，直接崩解。像是富勒烯氫化的情況，計算上是不會出現完全氫化的產物，因為不穩定。那麼經基化是不是也有類似的情形，有一個極限數量在，不同的加成產物是否存在不同的引入經基數量上限？實習期間對富勒烯崩潰的機制還不是很瞭解，如果球殼崩解可以刻意引發，那崩潰後的碎片會是呈現什麼樣的分佈，應該是以多環芳香烴(polycyclic aromatic hydrocarbon)為主，那這些多環芳香烴是平面還是會有曲面的結構？這些問題未有機會向實驗室成員詢問。

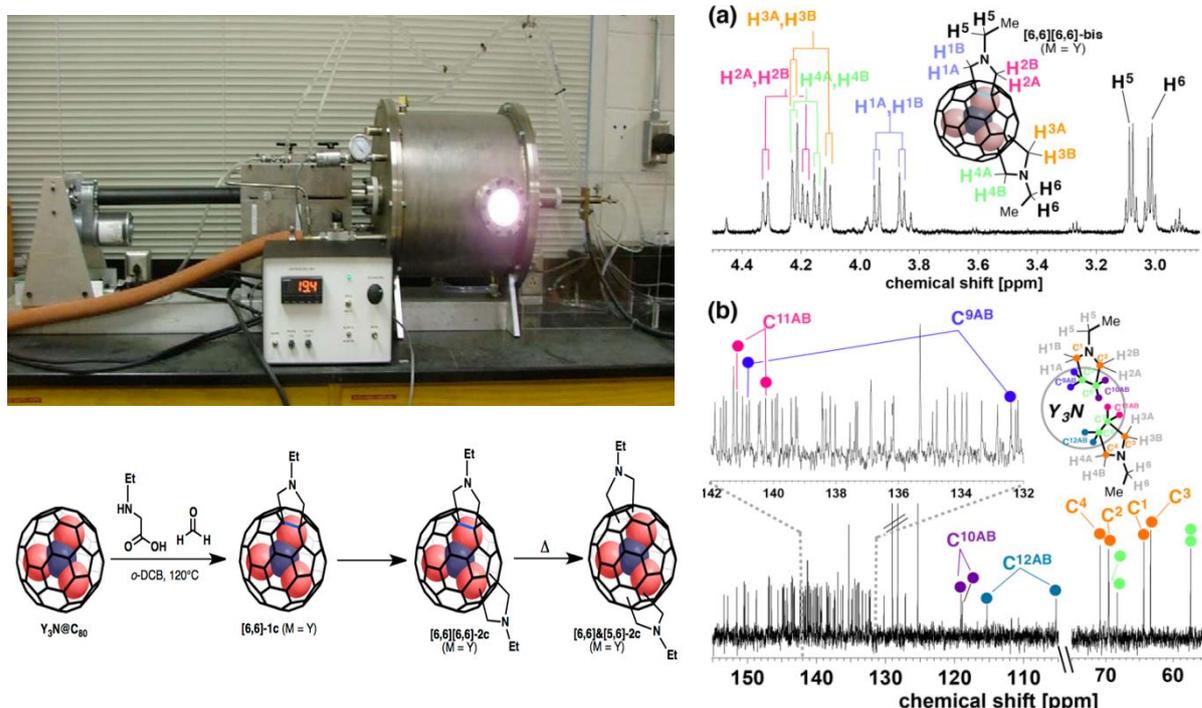
(四)、經基化水溶性富勒烯的標誌在 10 多年前已有報導，似乎可以直接標誌鎵、鎳，但是標誌機制不清楚^{18,19}，搜尋文獻也無詳細討論，可以猜測是富勒醇形成 nano-aggregates 時將放射性核種包在聚集的團塊之中，已報導的例子： $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x(\text{O})_y$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3-\text{C}_{60}(\text{OH})_{20}$ 。

如果能夠驗證這種標誌方式，那就代表可以在不需配位子的情況下進行放射標誌。可以聯想到若是使用內嵌釷的富勒烯，進行經基化，在富勒烯外標誌放射金屬核種，就具有成為雙模態造影劑應用的可能性。另外，前述提到的 PEG 修飾富勒烯，在水中是否也有可能吸附金屬，圖六的模型讓人容易想像金屬可以卡在 PEG 分支中，如果有辦法使其成為穩定的結構，讓金屬不易脫出，或許可以發展成一種標誌方法。



圖二十九、水溶性富勒烯於水中形成 nano-aggregates 示意圖

(五)、內嵌金屬富勒烯(endohedral metallofullerenes, EMF)可透過電弧放電(arc discharge)在實驗室中製備。(Krätschmer-Huffman arc reactor²⁰，於石墨棒中填入金屬化合物²¹)。但後續的分離鑑定不容易，有不含金屬的富勒烯、內嵌金屬富勒烯及其他富勒烯衍生物。內嵌金屬會影響富勒烯的反應性，不同的金屬、不同大小的富勒烯可能有不同的反應性。例如 C₈₀ 因內含金屬，在 Prato 條件下，得到選擇性的二次加成產物(Y₃N@C₈₀ bisadduct)²²。關於內嵌金屬富勒烯的反應，使用的量都在幾毫克，必須以 HPLC 追蹤反應、分離粗產物，鑑定位置異構物依靠光譜及二維實驗(如 ¹H-¹H COSY、HSQC、HMBC)，若是新化合物，通常也會搭配理論計算，如果能得到結晶對於結構解析更有幫助。內嵌金屬富勒烯的研究無論是自行製備或是購買昂貴的市售品，都是耗時費力花錢的項目，因此計畫需要有明確目的、互相支援的合作對象，才能使研究順利推展。



圖三十、Krätschmer-Huffman arc reactor²⁰ 及光譜鑑定 Y₃N@C₈₀ bisadduct²²

(六)、本次公差得以順利進行，職非常感謝計畫主持人于鴻文博士，在與大阪大學的行政作業時提供協助幫忙修改推薦信、回覆對方的詢問等，返台後的實習報告撰寫與討論；另外，櫻井實驗室對外國來訪者的友善安排也相當感謝，安排住宿在吹田分館，離實驗室近且生活機能不錯。

四、建議事項

(一)、與相關領域的國外實驗室保持接觸確保資訊流通

實習期間尋找文獻時，發現其他實驗室也有進行類似的研究：

- (1) 2016 年報導:德國 KIT 的 [Stefan Bräse](#) 合成富勒烯冠狀醚衍生物並和金屬配位²³。
- (2) 2016 年報導:法國 UDS (Université de Strasbourg)的 [Jean-François Nierengarten](#)，醜化富勒烯製備或是多價醜化富勒烯對於酵素的影響²⁴。
- (3) 2016 年報導:瑞士 ETH Zürich 的 [Yoko Yamakoshi](#)，研究水溶性 C60、C70、M₃N@C80 衍生物製備及應用、發展 Gd₃N@C80 為主的 MRI 對比劑。
- (4) 2017 年報導:西班牙加泰隆尼亞 UdG (Universitat de Girona)的 [Silvia Osuna](#)，討論富勒烯的芳香性²⁵對於內嵌金屬富勒烯反應性的影響。

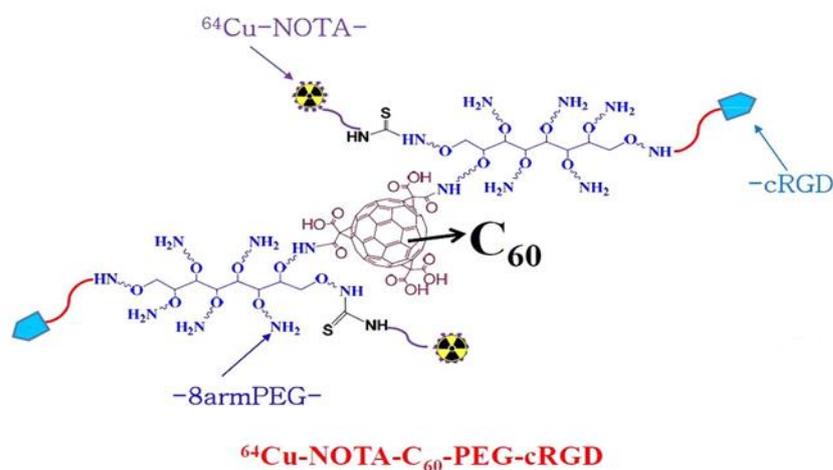
(二)、相對非熱門領域的多角化發展

自從 2003 年首次合成出花烯後，櫻井實驗室對於花烯相關的研究持續做到現在，實驗室在發展過程中，也有朝別的領域研究，金屬團簇的催化就是另一個主題。櫻井實驗室門口有兩張海報，上面分別寫著腕力、金力。簡單四個字代表這間實驗室的研究主題。碗烯可能是合成的早，所以國際上的研究團隊比較多，而花烯或許是由日本人合成出來的，所以之前日本的報導比較多，不過隨著實驗結果的累積，這個構造簡單的分子似乎有了新出路。去年櫻井和東工大的研究團隊報導利用 STM 探針，可以對一個個吸附在金屬表面上的花烯分子做碗狀構形的翻轉，使得碗面朝上或朝下翻轉是可以被操作的²⁶，花烯翻轉的性質有潛力用來開發分子硬碟之類的新科技。分子碗化學目前沒有超級熱門的應用，不算國際顯學，但是做這方面的團隊橫跨不同的學科，例如探討分子碗在固相中的結晶堆疊、富勒烯的超分子化學及各種非共價鍵結的複合物；分子碗與金屬配位的有機金屬化學，探討不同金屬在碗的凸面(convex)或凹面(concave)配位。而富勒烯有機金屬化合物雖然是已經被研究過的課題，但是如果用內嵌金屬富勒烯再和其他金屬形成有機金屬化合物又會是什麼情形，是否會對金屬活性造成改變，能否用在催化上？另有報導開口雜環富勒烯可能做為金屬配基，是理論上的結構²⁷，未必做的出來，但給有機化學家新目標，或許未來可以合成出目前只存在於理論計算的化合物，從而發現新的應用。

(三)、造影劑設計或製備可考慮使用富勒烯做為 linker 用途

內嵌金屬富勒烯因製備分離的複雜、藥品昂貴的成本問題，不建議在設備器材不齊或無相關領域的合作對象配合下，進行相關實驗。但一般造影劑設計或製備上常使用到的 linker，則可考慮使用富勒烯來嘗試看看，富勒烯後續的官能基修飾應用會比單純的 linker 來得廣。從原料成本來看，富勒烯市售品價格普通如一般試劑，且在相關實驗上，用量都在幾百毫克的範圍內，對於造影劑製備已經足夠；分離富勒烯衍生物，因有顏色，

直接用一般管柱沖提，配合光譜、質譜，可判斷是否有預期產物，不須額外增加設備，因此後續在造影劑設計或製備上，富勒烯可以做為 linker 的一個選項。(如圖二十九)²⁸



圖二十八、 $^{64}\text{Cu-NOTA-C}_{60}\text{-PEG-cRGD}$ conjugates²⁸

五、附錄

參考文獻

1. Konstantinos Avgoustakis *et al.* *Pharmaceutical Research*, **32**, 1676-1693 (2015)
2. S.J.Vance *et al.* *Biophysical Chemistry*, **214**, 27-32 (2016)
3. Ying Zhang *et al.* *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8**, 11246-11254 (2016)
4. Danica S. Jović *et al.* *RSC Adv.*, **6**, 38563 (2016)
5. Ievgen S. Donskyi *et al.* *Langmuir*, **33**, 6595-6600 (2017)
6. Wikipedia
7. Weibo Yan *et al.* *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 25 (2015)
8. Dr. Florian Beuerle 博士論文 Universität Würzburg (2008)
9. Ping Peng *et al.* *Chem. Commun.*, **49**, 3209 (2013)

10. Prof. Stefan Bräse (KIT Subproject C1.06)
11. Shinji Nomura *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2035-2041 (2004)
12. Ken Kokubo *et al.* *ACS Nano*, **2**, 327-333 (2008)
13. Wikipedia
14. Piotr Piotrowski *et al.* *J. Mater. Chem. A*, **2**, 2353-2362 (2014)
15. P. Piotrowski *et al.* *RSC Adv.*, **5**, 86771 (2015)
16. Yu-Wu Zhong *et al.* *Org. Lett.*, **8**, 1463-1466 (2006)
17. Yutaka Matsuo *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 6342-6348 (2010)
18. 李宇国 ^{67}Ga -C60(OH)_x 标记条件的研究 中国科学院上海原子核研究所 (2002)
19. 李晴暖 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -C60(OH)_x(O)_y 标记条件研究 中国科学院上海原子核研究所 (2001)
20. Bevan Craig Elliott 博士論文 Clemson University (2008)
21. 劉乃綸 碩士論文 國立中山大學 (2006)
22. Safwan Aroua *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 58-61 (2015)
23. Weibo Yan *et al.* *Chem. Eur. J.*, **22**, 11522-11526 (2016)
24. Abdellatif Tikad *et al.* *Chem. Eur. J.*, **22**, 13147-13155 (2016)
25. Marc Garcia-Borràs *et al.* *Inorganica Chimica Acta*, **468**, 38-48 (2017)
26. S. Fujii *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 12142-12149 (2016)
27. Yanbang Li *et al.* *Chem. Eur. J.*, **23**, 10485-10490 (2017)

28. Yayun Peng *et al.* *Acta Biomaterialia*, **61**, 193-203 (2017)