

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 化學科

第一名

050208

合成醣體螢光探針以用於腎臟癌細胞偵測

學校名稱： 國立嘉義高級中學

作者： 高二 吳柏儒 高二 何廣彙	指導老師： 洪瑞鼎
---------------------------------	------------------

關鍵詞： 綠色化學、機械化學、醣螢光癌症細胞探針

得獎感言

得獎感言

這次科展的成果，遠遠超出了我們原本的預期。從最初懷著忐忑的心情參加比賽，只希望能在區域賽留下些許足跡；到最終獲得第一名的榮耀，這一切都像是一場不真實的夢。回首這段旅程，我們的科展之路荊棘叢生。在實驗室為實驗焦頭爛額的假日與數不清的失敗，曾讓我們心生退意，也曾讓我們懷疑自己是否真的有能力完成這個研究。

所幸，我們還是撐過去了。這條路上，我們得到了太多人的幫助與支持。首先，我們要感謝李珮甄教授與實驗室的學長姐給予我們協助。接著，我們要特別感謝洪瑞鼎老師，在我們情緒最低落的時刻，適時給予鼓勵與安慰，讓我們有勇氣再一次站起來面對挑戰。最後，我們想感謝我們的家長，每次前往大學做實驗，都是由他們親自接送。正是因為有他們的支持，我們才能取得這次的成績。

然而，這次科展最大的收穫絕非當下的獎項，而是無數挫折後磨練出永不放棄的堅定意志與最終成果產出時的成就感。科學之路並非短跑，而是一場需要耐心與毅力的長征。這次的科展也並非我們研究的終點，期望這次的悸動能埋下種子，在未來開花結果。

這個世界充滿未知，持科學之明燈，遨遊於知識之海，探索未知，方能領略世間美好。期許學弟妹們多多參與研究，探索未知。縱使過程會遇到很多挫折，但我們相信關關難過關關過，只要有心，一切自會有最好的安排！



作者與指導老師合影



作者與指導教授李珮甄教授、游翌瑾學姊、
李承旭學長、翁建銘學長合影

作品名稱

合成醣體螢光探針以用於腎臟癌細胞偵測

摘要

本研究以合成 CCVJ-Sia 醣體螢光探針、分析它的螢光性質並用以檢測人類腎臟癌細胞為目的。透過設計一系列合成實驗，由起始物 Julolidine 與 Sialic acid，成功合成醣體螢光探針，並藉由螢光分光光譜儀得出其螢光強度與黏度具冪次關係，符合 TICT 理論。同時，我們亦探討改變醣上官能基、不同反應試劑當量數與使用球磨機反應不同時長分別對於醣基化修飾產率之影響，發現當反應試劑當量數高、反應時長適中（兩小時）、官能基氫鍵效應減小時，產率較高。此外，我們亦透過細胞實驗結果，確認探針能與特定癌細胞上 Siglecs 受體結合並產生螢光，由此推論此探針具有檢測腎臟癌細胞的效果。

壹、前言

一、研究動機與文獻回顧

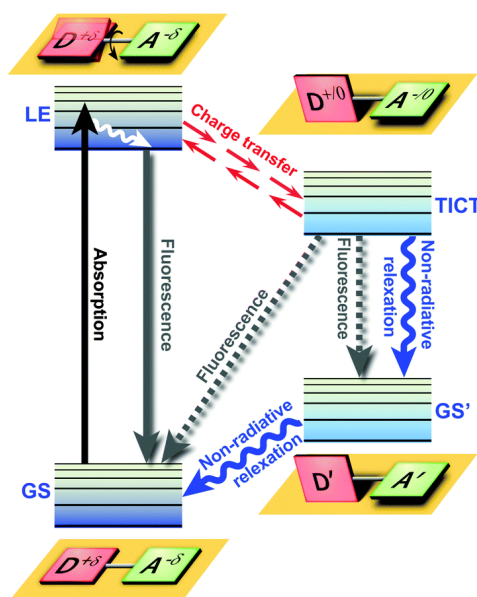
（一）醣體螢光探針之應用

螢光探針是一種會受特定波長的光激發，而發出螢光的化合物。常見的螢光探針可分為兩個類型。1、傳統螢光探針：使用傳統螢光染料染色目標細胞，常見螢光染料如亞甲藍（methylene blue）、蘇丹Ⅲ（Sudan Ⅲ）、花青染料（Cyanine Dye）、4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）。此類螢光染料無論是否與目標物結合皆會放出螢光，因此使用時須去除多餘染料，以避免背景干擾的問題；2、環境影響螢光增益探針（environment-sensitive fluorogenic probe），有別於傳統螢光探針，此類螢光染料開發出的螢光探針，有開啟（turn-on）螢光的功能。當探針未與目標結合時，螢光強度較弱或不存在，因此可避免背景干擾。此外螢光探針亦可根據結構分成三類，分別為螢光小分子探針（small molecular fluorescent probe）、螢光奈米粒子（fluorescent nanoparticle）和有機金屬探針（metal organic framework fluorescent probe）。本次科展主要合成螢光小分子探針（醣分子 CCVJ 探針），並探討其具 on-off 的性質。

（二）螢光發光機制

螢光係指分子照射特定波長的光後，吸收能量並放出另一波長的光。常見螢光機制有七種。本實驗合成的醣體螢光探針之發光機制屬扭曲內分子電荷轉移（Twisted Intramolecular Charge Transfer, TICT）。此種分子對環境的黏稠度敏感，在黏稠度高或高極性的溶劑較容易出現螢光現象。TICT 理論描述當分子內的電子供體（donor）與電子受體（acceptor）之間存在可旋轉的單鍵時，將因立體構型不同而出現不同

能階。如圖一，當此種分子受光激發到激發態時，電子可能以不同路徑轉移，進而產生螢光²。



(圖一) TICT 分子變化示意圖 (圖片來源自參考文獻¹)

(三) 癌細胞表面上之醣受體

癌細胞細胞膜表面上存在許多醣受體，這些蛋白質可辨識醣體並與其結合，亦有調控免疫系統的功能。其中，Siglecs (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins) 也是一種醣辨識蛋白，在人類中共有15種，主要出現在人類免疫細胞上，可調節免疫細胞的活性。癌細胞可透過過度表達細胞膜上的唾液酸，與免疫細胞上的 siglec 結合，降低免疫細胞的活性。此外，在人類亮細胞腎癌細胞 (renal clear cell carcinoma) 上亦有發現 Siglecs 的過度表達^{3, 4}，因此可藉由 Siglec 與唾液酸結合的特性將唾液酸作為生物標記 (biomarker) 與螢光染劑結合，以此針對腎臟癌細胞的顯影。

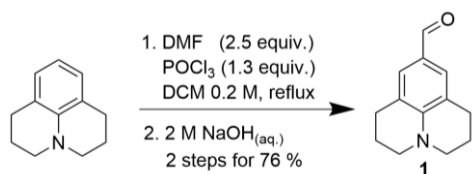
(四) 機械化學與綠色化學

機械化學是指由機械力 (壓縮、剪切、摩擦) 引起的化學反應。早在上古時代，人們便在無意間使用了機械化學的原理，如常見的研磨穀物其實就是機械化學的應用之一⁵。近年來隨著綠色化學的興起，採用機械化學進行複雜或無溶劑的反應成了一門顯學。新式方法使用球磨機合成化合物，可大量減少溶劑的浪費，同時可減少反應時間。本研究透過改變當量數、球磨機條件 (時間、頻率) 與官能基期待找到最佳產率。本次研究採用球磨機合成中間產物，將機械化學帶入醣合成。

(五) 合成 CCVI

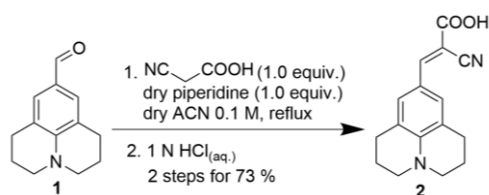
參考文獻⁶，先以 Julolidine 作為起始物，使用 *N,N*-二甲基甲醯胺與三氯氧磷在二氯

甲烷下進行維爾斯邁爾-哈克反應（Vilsmeier-Haack reaction）3.5h，並且使用2 M 的氫氧化鈉溶液，得到化合物1。（式1）



（1）圖片由作者繪製

參考文獻，以化合物1為起始物，使用氰乙酸，以哌啶（Piperidine）為鹼，在乙腈下進行克內弗納格爾縮合反應（Knoevenagel condensation）10h，並且以1 N HCl 結束反應，得到化合物2（CCVJ）。（式2）



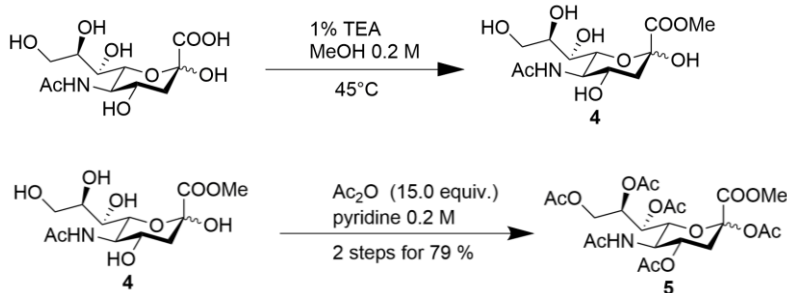
（2）圖片由作者繪製

（六）具長碳鏈唾液酸的結構合成測試

本實驗使用唾液酸家族中較常出現於人體的 *N*-Acetylneuraminic acid，以下皆以唾液酸代稱。

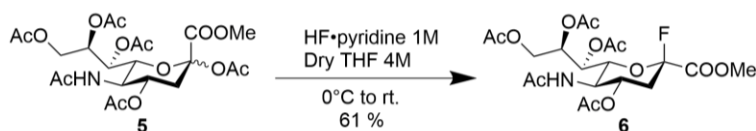
先將唾液酸上的羥基與羧基接上保護基得到化合物5，避免接下來的反應受到干擾。

（式3）



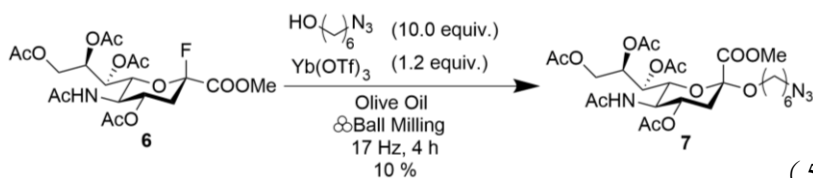
（3）圖片由作者繪製

接著以化合物5 與吡啶氫氟酸錯合物在 THF 下反應2 h，得到化合物6。（式4）



（4）圖片由作者繪製

最後參考文獻⁷，以化合物6 為起始物，使用6-疊氮基己醇，在球磨機內反應2 h，得到化合物7。（式5）



（5）圖片由作者繪製

二、研究目的

- 一、透過一系列反應合成醣體螢光探針
- 二、比較醣上不同官能基對球磨機進行醣基化修飾之產率影響
- 三、探討不同反應物當量數對球磨機進行醣基化修飾之產率影響
- 四、探討不同球磨機反應時間球磨機合成產率的影響
- 五、探討溶劑黏度對醣體螢光探針螢光強度影響
- 六、檢視醣體螢光探針應用於細胞檢測的成效

貳、研究設備與器材

一、實驗藥品總覽

藥品名稱	化學式	藥品名稱	化學式
乙酸乙酯	$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	三氟乙酸	CF_3COOH
己烷	Hexanes	甲醇	CH_3OH
三氟甲烷磺酸鎢	$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Yb}$	乙酸酐	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{O}$
6-疊氮基己醇	$\text{N}_3(\text{CH}_2)_6\text{OH}$	吡啶	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$
唾液酸	<i>N</i> -Acetylneuraminic acid	1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亞胺	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$
乙酸異丙烯酯	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$	吡啶氫氟酸錯合物	$\text{HF}\cdot\text{pyridine}$
四氫呋喃	$(\text{CH}_2)_4\text{O}$	橄欖油（非試藥級）	olive oil
N,N-二甲基甲醯胺	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$	N-羥基琥珀醯亞胺	$\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$
三氯氧磷	POCl_3	哌啶	$(\text{CH}_2)_5\text{NH}$
氰乙酸	$\text{NC}(\text{CH}_2)\text{COOH}$	Julolidine	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}$
乙腈	CH_3CN	樟腦磺酸	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{S}$
苯甲醇	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$	乙酸	CH_3COOH
三乙胺	$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$	二甲基亞砷	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
甲苯	C_7H_8	丙三醇（甘油）	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$




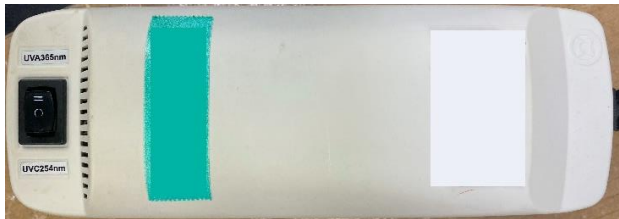
二、實驗藥品縮寫總覽

藥品名稱	縮寫	藥品名稱	縮寫
乙酸乙酯	EtOAc	三氟乙酸	TFA

三氟甲烷磺酸鎢	Yb (OTf) ₃	甲醇	MeOH
乙酸酐	Ac ₂ O	樟腦磺酸	CSA
四氫呋喃	THF	N-羥基琥珀醯亞胺	NHS
乙腈	ACN	1-乙基-3-(3-二甲基 氨基丙基) 碳二亞胺 鹽酸鹽	EDC · HCl
苯甲醇	BnOH	二甲基亞碲	DMSO



三、處理與反應設備

微量吸量管	中量快速球磨機 MM400
	
精密四位數天秤	Silica gel 正向管柱層析
	
真空抽氣機	迴旋減壓濃縮儀
	

C18逆相層析管柱	迴旋減壓濃縮儀（使用液氮降溫）
	
加熱攪拌器	手持式紫外燈光
	

（圖片均來自作者於實驗室拍攝所得）

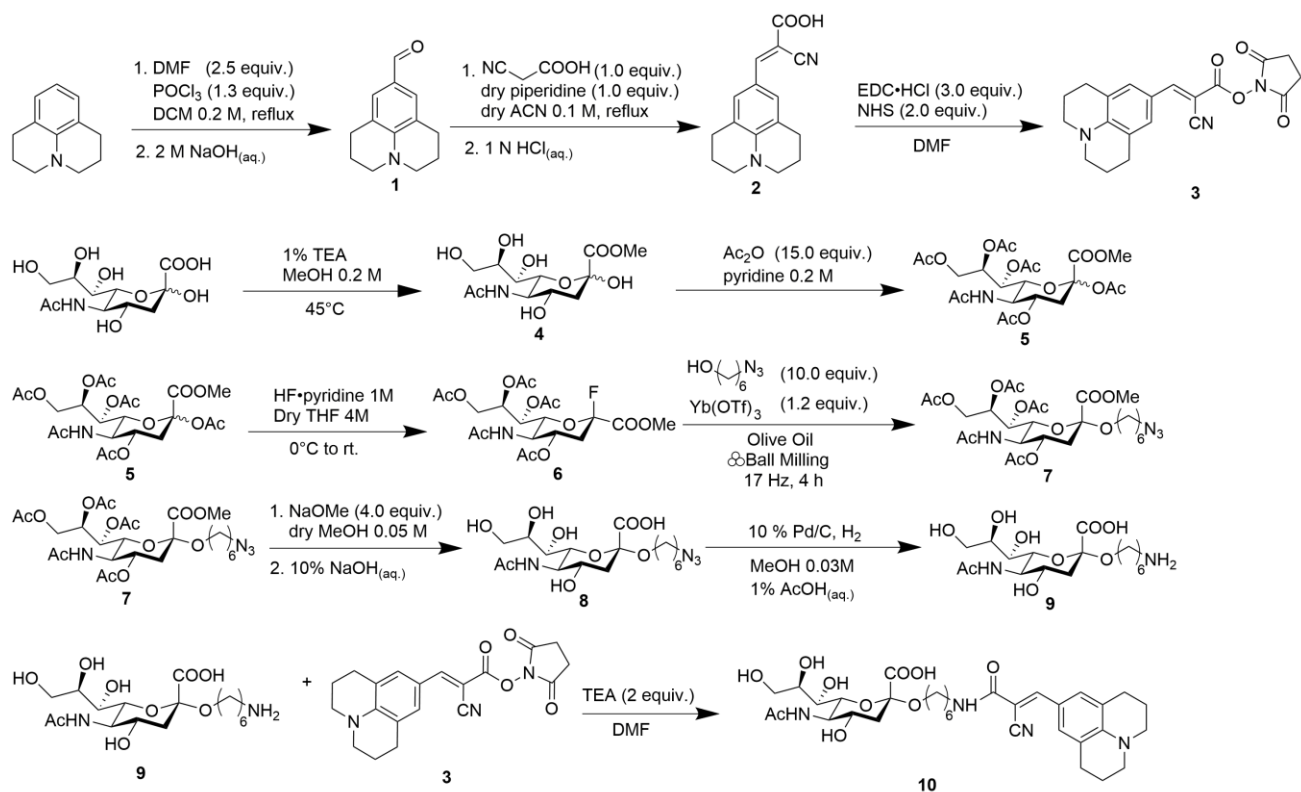
四、分析儀器

核磁共振光譜儀（NMR）	F-7000 高感度、多功能螢光分光光譜儀
	
HRMS ESI 質譜儀	

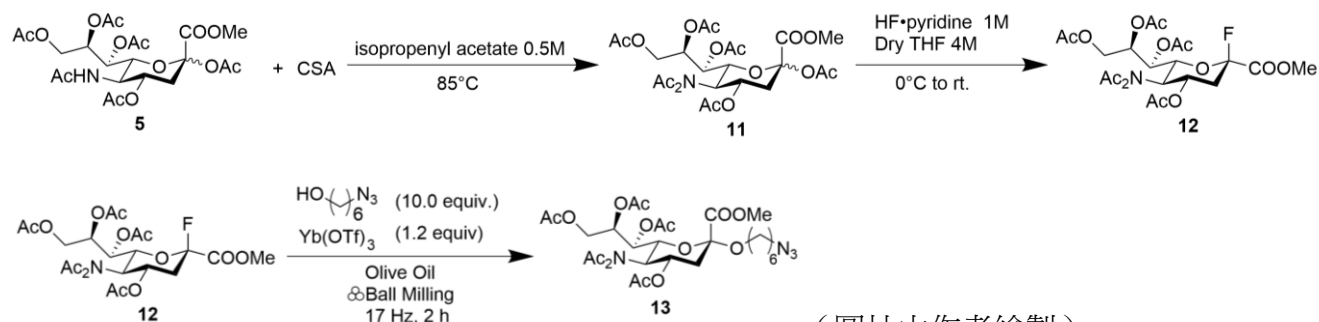
（圖片均來自作者於實驗室拍攝所得）

參、研究過程與方法

為了合成出 CCVJ-Sia 醣體螢光探針，在查找文獻與參考實驗室學長的合成步驟後，我們設計了以下的合成計畫，以合成化合物10為目標之醣體螢光探針進行合成，設計的探針具有可與 Siglecs 受體結合的 Sialic acid 與受微環境影響螢光強度的螢光基團。（圖片由作者繪製）

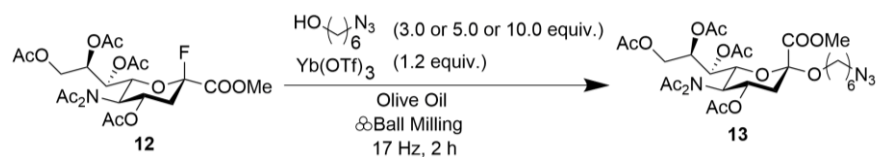


為比較醣上不同官能基使用球磨機合成之產率，我們改變5號碳上官能基，比較化合物7和化合物13之產率，以下為合成步驟：



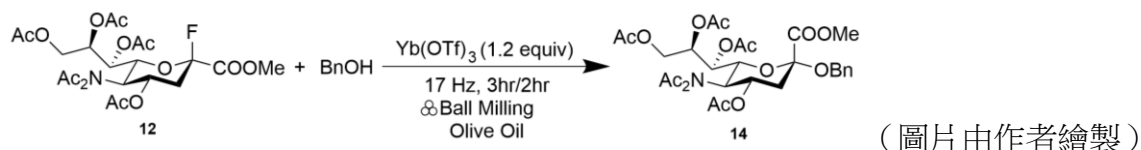
（圖片由作者繪製）

為比較反應試劑6-疊氨基己醇當量數對球磨機合成產率影響，分別使用當量數3、5、10做實驗，以下為反應式：



（圖片由作者繪製）

同時為找出較好的球磨機條件，我們以 BnOH 作為參照物設計兩組實驗，比較時間對球磨機合成的產率的影響，以下為反應式：



一、利用 Julolidine 合成化合物1

(一) 準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼 (CAS No.) 在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質 (MSDS)。
2. 利用真空抽氣機去除殘留在針內水氣 (此步驟以下簡稱抽某型號針)，包含1支 1.0 mL 塑膠針筒 (以下簡稱綠針)，1支2.0 mL 玻璃針筒，2支20.0 mL 玻璃針筒，2支20號鐵針，2支18號鐵針，為時1 h。另取兩50.0 mL 圓底瓶 (A、B)，以噴槍加熱圓底瓶以去除其中水分，待其冷卻後再次執行加熱 (此步驟以下簡稱烤瓶)，連續執行3次 (約20分鐘)。
3. 取 Julolidine 1000 mg 與一磁石，加入另一100.0 mL 圓底瓶 (C)，利用真空幫浦抽除空氣至真空以去除水分，為時1 h。

(二) 實驗步驟

1. 取 A 瓶，準備兩 N₂氣球與一個血清塞，於 A 瓶瓶口裝上血清塞，並插上 N₂氣球 (此步驟以下簡稱轉移)，加入適量 DCM (約半滿)，再取 B 瓶，準備兩 N₂氣球與一個血清塞，轉移時加入一磁石。
2. 取 A 瓶，準備兩 N₂氣球與一個血清塞轉移，加入適量 DCM (約半滿)。
3. 取 B 瓶，準備兩 N₂氣球與一個血清塞，轉移時加入一磁石。
4. 取20.0 mL 玻璃針筒一支，從 A 瓶抽1.0 mL DCM，加至 C 瓶。同一支針筒，抽 26.0 ml DCM 入 B 瓶。
5. 取2.0 mL 玻璃針筒，抽 DMF 1.1 mL，加入 B 瓶，開始攪拌，並冰浴 A 瓶15分鐘。
6. 取一綠針，抽 POCl₃，滴加入 B 瓶。
7. 將 B 瓶移出冰浴回到室溫，攪拌15分鐘，準備迴流管，纏止洩帶，架 probe 於加熱攪拌器。
8. 取兩 N₂氣球與一個血清塞，轉移 C 瓶至加熱攪拌器，取一20.0 mL 玻璃針筒將 B 瓶內溶液加至 C 瓶中，架迴流裝置，溫度60°C，反應3.5 h。
9. 準備2 M NaOH (aq.)，在冰浴下以滴管加 NaOH (aq.) 到反應瓶中直到不冒泡。

(三) 純化步驟

1. 以 DCM 和水萃取，回萃水層三次，收集有機相，水相點片無產物後，有機相加入飽和食鹽水去除水，再加入 Na_2SO_4 去除水，使用濃縮機減壓濃縮。
2. 配製一管柱（4 cm 管，由下而上為棉花-矽膠與正己烷混合物-產物），進行管柱層析。使用溶劑比例： $\text{EtOAc/Hexanes} = 1/10、1/3、1/2、2/1$ 。在管柱層析的過程中定時透過 TLC 片確認目標產物是否流出，並收集含有目標產物的溶液。
3. 將所收集的溶液使用濃縮機進行迴旋減壓濃縮後在真空下抽乾溶劑。

(四) 鑑定步驟

1. 取濃縮後的產物溶於 CDCl_3 後進行 NMR 鑑定，確認該產物是否為目標產物。
2. 用高真空幫浦儀抽乾溶劑並扣除空瓶重，得到產物重並計算產率。

二、利用化合物1合成化合物2：

(一) 準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼（CAS No.）在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質（MSDS）。
2. 利用真空抽氣機抽針，含1支綠針，2支2.0 mL 玻璃針筒，1支20.0 mL 玻璃針筒，1支18號鐵針，3支20號鐵針，抽1 h。
3. 取一100.0 mL 圓底瓶（A），裝入化合物1，再加入氰乙酸，利用真空幫浦抽除空氣至真空。
4. 取一5.0 mL 圓底瓶（B），加入3 Å MS（20%，新鮮活化的分子篩），另取50.0 mL 圓底瓶（C），皆進行真空烤瓶20分鐘。

(二) 實驗步驟

1. 取四個 N_2 氣球與兩血清塞，分別轉移 B 和 C 瓶，並在 B 瓶中放入一磁石。
2. C 瓶加入 ACN 約35.0 mL，取一綠針抽吡啶 300 μL 加入 B 瓶，再取另一綠針從 C 瓶抽 ACN 2.0 mL 加入 B 瓶，B 瓶攪拌5分鐘，再靜置15分鐘沉澱 MS。
3. 取兩 N_2 氣球與一個血清塞，轉移 A 瓶至加熱攪拌器，架 probe，取一綠針抽 B 瓶內溶液1150 μL 加入 A，再取一20.0 mL 玻璃針筒由 C 抽29.0 mL ACN 加入 A 瓶。
4. 架迴流裝置，溫度105 $^\circ\text{C}$ ，反應10 h。

(三) 純化步驟

1. 以 EtOAc 和水萃取，回萃水層三次，收集有機相，水相點片無產物後，有機相加飽和食鹽水去除水，再加入 Na_2SO_4 去除水，並以濾紙過濾，使用濃縮機進行

減壓濃縮。

2. 配製一管柱（3 cm 管，由下而上為棉花-矽膠與正己烷混合物-產物），進行管柱層析。使用溶劑比例：EtOAc/Hexanes = 1/30、1/10、1/5。在管柱層析的過程中定時透過 TLC 片確認目標產物是否流出，並收集含有目標產物的溶液。

（四）鑑定步驟

1. 取濃縮後的產物溶於 DMSO 後進行 NMR 鑑定，確認該產物是否為目標產物。
2. 用高真空幫浦儀抽乾溶劑並扣除空瓶重，得到產物重並計算產率。

三、利用化合物2合成化合物3：

（一）準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼（CAS No.）在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質（MSDS）。

（二）實驗步驟

1. 取一25.0 mL 圓底瓶（A），秤取化合物2 200 mg 裝入，並放入一磁石，加入 DMF。
2. 將 EDC·HCl 放入 A 瓶，再將 NHS 放入 A 瓶，再將 A 瓶置於加熱攪拌器上，攪拌30分鐘。

（三）純化步驟

1. 以 EtOAc 和水萃取，回萃水層三次，收集有機相，水相點片無產物後，有機相加飽和食鹽水去除水，再加入 Na₂SO₄去除水，並以濾紙過濾，使用濃縮機進行減壓濃縮。
2. 配製一管柱（2 cm 管，由下而上為棉花-矽膠與正己烷混合物-產物），進行管柱層析。使用溶劑：DCM。

（四）鑑定步驟

1. 取濃縮後的產物溶於 CDCl₃後進行 NMR 鑑定，確認該產物是否為目標產物。
2. 用高真空幫浦儀抽乾溶劑並扣除空瓶重，得到產物重並計算產率。

四、利用 Sialic acid 合成化合物4：

（一）準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼（CAS No.）在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質（MSDS）。

（二）實驗步驟

1. 取一250.0 mL 圓底瓶（A），秤取 Sialic acid 5 g 裝入，並放入一磁石。

2. 加 MeOH 入 A 瓶，再加 TFA 入 A 瓶，置 A 瓶於加熱攪拌器上。
3. 架迴流管，不須通水，水浴加熱到45 °C。反應 3 d 14 h。
4. 先以迴旋減壓濃縮儀抽除 MeOH，再利用甲苯與 TFA 形成共沸後，利用減壓濃縮去除 TFA，不用純化，直接進行合成化合物5。

五、利用化合物4合成化合物5：

（一）準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼（CAS No.）在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質（MSDS）。

（二）實驗步驟

1. 取一250.0 mL 圓底瓶（A），秤取裝入化合物4，並放入一磁石。
2. 緩慢滴加吡啶入 A 瓶，再加 Ac₂O 入 A 瓶。
3. 進行水浴（以溫度計確保溫度保持在45 °C），以 TLC 片追蹤反應，反應18 h。

（三）純化步驟

1. 先以 MeOH 去除 Ac₂O，再以1 N HCl 去除吡啶。
2. 以 EtOAc 和水萃取，回萃水層三次，收集有機相，水相點片無產物後，有機相加飽和食鹽水去除水，再加入 Na₂SO₄去除水，並以濾紙過濾，使用濃縮機進行減壓濃縮。
3. 配製一管柱（由下而上為棉花-矽膠與正己烷混合物-產物），進行管柱層析。使用溶劑比例：EtOAc/Hexanes = 1/1、2/1，EtOAc/Hexanes/MeOH = 2/1+5%、2/1+10%。管柱層析的過程中定時透過 TLC 片確認目標產物是否流出，並收集含有目標產物的溶液。

六、利用化合物5合成化合物6：

（一）準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼（CAS No.）在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質（MSDS）。
2. 取一塑膠 sample vial（A），裝入化合物5，利用真空幫浦抽除空氣至真空，為時1 h。
3. 抽2支綠針，2支18號鐵針，烤瓶一10.0 mL 圓底瓶（B）。

（二）實驗步驟

1. A 瓶取下真空，上血清塞和 Ar 氣球。
2. B 瓶裝 Dry THF，A 瓶於冰浴下以綠針加入 Dry THF，再取另一綠針慢慢加入

HF·Pyridine 入 A 瓶。

3. 15分鐘後移出冰浴，置於加熱攪拌器上，攪拌2 h。

(三) 純化步驟

1. 備飽和 NaHCO_3 (aq.) 約100.0 mL 於250.0 mL 圓底瓶 (C) 中並冰浴，滴加 A 瓶中產物入 C 瓶中。
2. 先以飽和 NaHCO_3 (aq.) 和 EtOAc 萃取，再以 H_2O 和 EtOAc 萃取。
3. 以1 N HCl (aq.) 和 EtOAc 萃取，再以 H_2O 和 EtOAc 萃取，水相點片無產物後，有機相加飽和食鹽水去除水，再加入 Na_2SO_4 去除水，並以濾紙過濾，使用濃縮機進行減壓濃縮。
4. 配製一管柱 (2 cm 管，由下而上為棉花-矽膠與正己烷混合物-產物)，進行管柱層析。使用溶劑比例： $\text{EtOAc/Hexanes} = 1/1$ ， $\text{EtOAc/Hexanes/MeOH} : 2/1+1\%$ 、 $2/1+2\%$ 、 $2/1+3\%$ 、 $2/1+4\%$ 。

七、利用化合物6合成化合物7：

(一) 準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼 (CAS No.) 在實驗室記錄冊查找藥品的基本性 (MSDS)。

(二) 實驗步驟

1. 加化合物6於球磨罐 (材質為 ZrO_2)，放入一直徑為10 mm ZrO_2 球。
2. 以微量滴管加入 $\text{HO}(\text{CH}_2)_6\text{N}_3$ 與 Olive Oil 18 μL 。
3. 加入 $\text{Yb}(\text{OTf})_3$
4. 將球磨罐置於球磨機中，球磨機設定17 Hz，反應2 h 停機30 min，再反應2 h。

(三) 純化步驟

1. 先以飽和 NaHCO_3 (aq.) 和 EtOAc 萃取，再以 H_2O 和 EtOAc 萃取，水相點片無產物後，有機相加飽和食鹽水去除水，再加入 Na_2SO_4 去除水，並以濾紙過濾，使用濃縮機進行減壓濃縮。
2. 配製一管柱 (2 cm 管，由下而上為棉花-矽膠與正己烷混合物-產物)，進行管柱層析。使用溶劑比例： $\text{EtOAc/Hexanes} = 2/1$ ， $\text{EtOAc/Hexanes/MeOH} : 2/1+1\%$ 、 $2/1+2\%$ 、 $2/1+4\%$ 、 $2/1+6\%$ 。管柱層析的過程中定時透過 TLC 片確認目標產物是否流出，並收集含有目標產物的溶液。

(四) 鑑定步驟

1. 取濃縮後的產物溶於 CDCl_3 後進行 NMR 鑑定，確認該產物是否為目標產物。

2. 用高真空幫浦儀抽乾溶劑並扣除空瓶重，得到產物重並計算產率。

八、利用化合物7合成化合物8：

（一）準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼（CAS No.）在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質（MSDS）。
2. 抽1支綠針，為時1 h。
3. 取化合物7與一磁石，加入玻璃 sample vial（A），利用真空幫浦抽除空氣至真空去除水，為時1 h。
4. 準備 C18逆相層析管柱，使用溶劑：MeOH 100%、MeOH 50%/H₂O 50%、H₂O 100%。

（二）實驗步驟

1. 加 dry MeOH 於 A 瓶，冰浴10分鐘，加入 NaOMe，攪拌10分鐘後移出冰浴。
2. 反應40分鐘並利用 TLC 確定反應完成後，加入10% NaOH (aq.)，再反應30分鐘。

（三）純化步驟

1. 將產物加入 C18逆相層析管柱中，再進行純化。使用溶劑比例：MeOH 95%/H₂O 5%，MeOH 90%/H₂O 10%，MeOH 85%/H₂O 15%。管柱層析的過程中定時透過 TLC 片確認目標產物是否流出，並收集含有目標產物的溶液。
2. 將收集到之目標產物現用迴旋減壓濃縮儀抽除 MeOH，再使用高真空抽除水，完成濃縮。

（四）鑑定步驟

1. 取濃縮後的產物溶於 D₂O 後進行 NMR 鑑定，確認該產物是否為目標產物。
2. 用真空幫浦儀抽乾溶劑並扣除空瓶重，得到產物重並計算產率。

九、利用化合物8合成化合物9：

（一）準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼（CAS No.）在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質（MSDS）。
2. 取一50.0 mL 圓底瓶（A），加入化合物8，並放入一磁石，利用真空幫浦抽除空氣至真空去除水，為時1 h。

（二）實驗步驟

1. 取兩個 N₂氣球與一個血清塞，轉移 A 瓶，量取5 mg Pd/C 並倒入 A 瓶
2. 取一2.0 mL 塑膠針筒，將2.0 mL MeOH 加入 A 瓶。

3. 以微量滴管取80 μL AcOH 加入 A 瓶。
4. 將 A 瓶之血清塞更換為三向閥，在瓶口與三向閥連接處以 parafilm 密封。
5. 三向閥剩餘兩端，其一連接真空幫浦，另一端裝上 H_2 氣球。
6. 三向閥先轉至通向 H_2 氣球與 A 瓶，再將三向閥轉至通向真空幫浦與 A 瓶，抽除瓶中空氣，重複步驟6四到六次，以確保 H_2 充滿於 A 瓶中。
7. 將 A 瓶置於加熱攪拌器上，反應每40分鐘點片一次，點片後執行步驟6，確保 H_2 充滿於 A 瓶中。總共反應2 h。

(三) 純化步驟

1. 玻璃過濾漏斗下方放置一250.0 mL 圓底瓶 (B)，填充 Celite 到玻璃過濾漏斗一半，並壓實 Celite。
2. 以玻璃滴管將 A 瓶中溶液加於 Celite。
3. 加入 MeOH 於玻璃過濾漏斗中直到液面高於漏斗中填充的 Celite 表面，玻璃過濾漏斗連接抽氣幫浦，抽氣使漏斗中液面下降。
4. 輪流以丙酮和 MeOH 抽濾，反覆執行步驟3十次。
5. 點片確認無產物從玻璃過濾漏斗中被濾出，且 B 瓶中經點片確認有產物，使用迴旋減壓濃縮儀將 B 瓶中溶液進行減壓濃縮，無須經管柱層析純化，直接進行合成化合物10。

十、利用化合物9與化合物3合成化合物10：

(一) 準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼 (CAS No.) 在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質 (MSDS)。
2. 準備 C18逆相層析管柱，使用溶劑比例：MeOH 100%、MeOH 50%/H₂O 50%、H₂O 100%。

(二) 實驗步驟

1. 加9.9 mg 化合物3於一25.0 mL 圓底瓶 (A)，並加入一磁石，利用真空幫浦抽除空氣至真空去除水，為時1 h。
2. 以2.0 mL 塑膠針筒抽取0.5 mL DMF，加入含化合物9之圓底瓶中溶解化合物9，再將此加入 A 瓶中，重複3次。
3. 以微量滴管取 TEA 8 μL 加至 A 瓶中，並將 A 瓶置於加熱攪拌器上，反應1 h。

(三) 純化步驟

1. 利用 TLC 確定反應完成後，先利用高真空幫浦儀抽除部分 DMF，將剩下溶液加

入 C18 逆相層析管柱中，再進行純化。使用溶劑比例：MeOH 95%/H₂O 5%，MeOH 90%/H₂O 10%，MeOH 85%/H₂O 15%。管柱層析的過程中定時透過 TLC 片確認目標產物是否流出，並收集含有目標產物的溶液。

2. 將收集到之目標產物現用迴旋減壓濃縮儀抽除 MeOH，再使用高真空抽除水，完成濃縮。

(四) 鑑定步驟

1. 取濃縮後的產物溶於 CDCl₃ 後進行 NMR 鑑定，確認該產物是否為目標產物。
2. 用高真空幫浦儀抽乾溶劑並扣除空瓶重，得到產物重並計算產率。

十一、利用化合物5合成化合物11：

(一) 準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼 (CAS NO.) 在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質 (MSDS)。
2. 取一 50.0 mL 圓底瓶 (A) 並放入磁石與化合物5，以真空幫浦抽除空氣至真空去除水分。
3. 取一 N₂ 氣球與血清塞，轉移 A 瓶。

(二) 實驗步驟

1. 加 CSA 於 A 瓶中。
2. 緩慢滴加 isopropenyl acetate 入 A 瓶中。
3. 準備迴流管，纏止洩帶，架 probe 於加熱攪拌器，加熱到 85°C。
4. 以 TLC 片追蹤反應。

(三) 純化步驟

1. 反應結束後以飽和 NaHCO₃ (aq.) / EtOAc 萃取。
2. 配製一管柱 (由下而上為棉花-矽膠與正己烷混合物-產物)，進行管柱層析。
3. 在管柱層析的過程中定時透過 TLC 片確認目標產物是否流出，並收集含有目標產物的溶液。
4. 將所收集的溶液進行迴旋濃縮後在高真空下抽乾溶劑。

(四) 鑑定步驟

1. 取濃縮後的產物溶於 CDCl₃ 後進行 NMR 鑑定，確認該產物是否為目標產物。
2. 用高真空幫浦儀抽乾溶劑並扣除空瓶重，得到產物重並計算產率。

十二、利用化合物11合成化合物12：

(一) 準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼 (CAS No.) 在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質 (MSDS)。
2. 取一塑膠 sample vial (A) 並放入磁石與化合物11，抽2支綠針、2支18號鐵針。

(二) 實驗步驟

1. 冰浴 THF，轉移 A 瓶，並將 A 瓶置於冰浴下15分鐘。
2. 緩慢滴加 THF 與 HF·pyridine 入 A 瓶，於15分鐘後移除冰浴。
3. 以 TLC 片追蹤反應。

(三) 純化步驟

1. 反應結束後以圓底瓶裝取飽和 NaHCO_3 (aq.) 緩慢滴入產物，避免反應過劇。
2. 以飽和 NaHCO_3 (aq.) 和 EtOAc 萃取，並回萃水層。
3. 以1N HCl (aq.) 和 EtOAc 萃取，並回萃水層。
4. 配製一管柱 (由下而上為棉花-矽膠與正己烷混合物-產物)，進行管柱層析。在管柱層析的過程中定時透過 TLC 片確認目標產物是否流出，並收集含有目標產物的溶液。
5. 將所收集的溶液進行迴旋減壓濃縮後在高真空下抽乾溶劑。

(四) 鑑定步驟

1. 取濃縮後的產物溶於 CDCl_3 後進行 NMR 鑑定，確認該產物是否為目標產物。
2. 用高真空幫浦儀抽乾溶劑並扣除空瓶重，得到產物重並計算產率。

十三、利用化合物12合成化合物13：

(一) 準備步驟

1. 透過化學文摘社登記號碼 (CAS No.) 在實驗室記錄冊查找藥品的基本性質 (MSDS)。

(二) 實驗步驟

1. 加化合物12於球磨罐 (材質為 ZrO_2) 中，放入一直徑10 mm ZrO_2 球。
2. 以微量吸管加入 $\text{N}_3(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ 與 Olive oil 18 μL 。
3. 加入 $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ 。
4. 將球磨罐置於球磨機中，球磨機設定17 Hz，反應2 h。

(三) 純化步驟

1. 反應結束後以圓底瓶裝取飽和 NaHCO_3 (aq.) 緩慢滴入產物，避免反應過劇。
2. 以飽和 NaHCO_3 (aq.) 和 EtOAc 萃取，並回萃水層。
3. 配製管柱 (由下而上為棉花-矽膠與正己烷混合物-產物)，進行管柱層析。在管

柱層析的過程中定時透過 TLC 片確認目標產物是否流出，並收集含有目標物的溶液。

4. 將所收集的溶液進行迴旋減壓濃縮後在高真空下抽乾溶劑。

(四) 鑑定步驟

1. 取濃縮後的產物溶於 CDCl_3 後進行 NMR 鑑定，確認該產物是否為目標產物。
2. 用高真空幫浦儀抽乾溶劑並扣除空瓶重，得到產物重並計算產率。

十四、醣體螢光探針之細胞實驗操作流程：

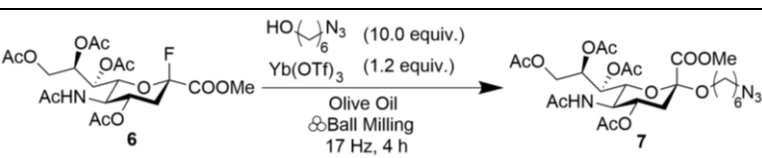
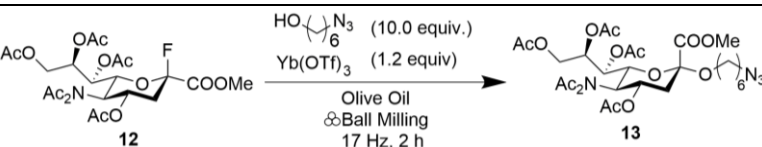
(一) 將每孔3000顆 HepG2與 PANC-1細胞，分別以200 μL 的 MEM 與 DMEM 培養基接種於48孔培養盤中，置於37°C、5% CO_2 的培養箱中培養24小時，使細胞貼附於48孔盤底部。

(二) 培養24小時後，移除原培養基，以100 μL PBS 溶液（磷酸鹽緩衝溶液）潤洗兩次，再於孔中加入含20 μM CCVJ-Sia 的 PBS 溶液，並立即置於螢光顯微鏡下觀察與拍攝。

肆、研究結果

一、改變糖上官能基對球磨機合成產率影響的結果

藉由改變糖的5號碳上官能基，探討官能基為 NHAc 與 NAc_2 時對合成產率影響。

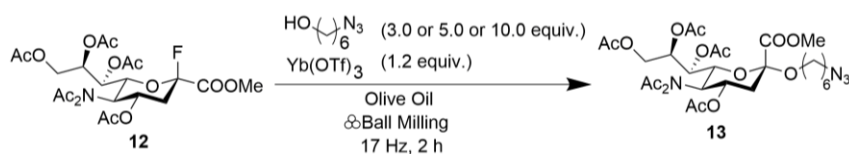
5號碳上官能基	反應	產率
NHAc		10 %
NAc_2		28 %

（圖片由作者繪製）

二、改變反應試劑當量數對球磨機合成產率影響的結果

藉由改變6-疊氮基己醇的當量數，探討反應試劑對球磨機合成產率影響。

反應式：



（圖片由作者繪製）

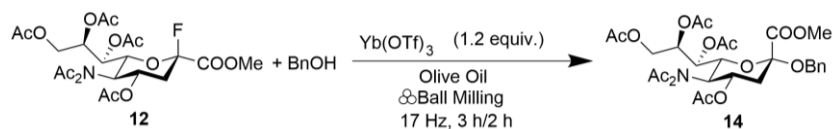
項次	6-疊氮基己醇當量數	化合物13之產率
----	------------	----------

1	3	17 %
2	5	22 %
3	10	28 %

三、改變反應時間對球磨機合成產率影響的結果

藉由設定球磨機的運轉時間，探討反應時間對球磨機合成產率影響。

反應式：



(圖片由作者繪製)

項次	反應時間	化合物14之產率
1	2 h	15%
2	1.5 h → 休息10 min → 1.5 h	3%

產率分析：由 TLC 結果顯示項次2有較多未知反應，產率因而下降



項次1



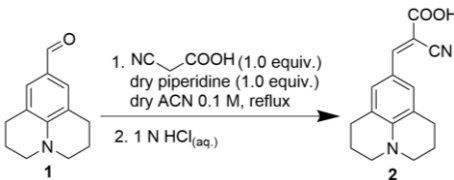
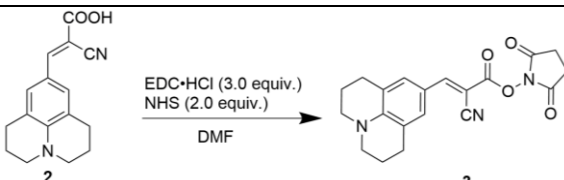
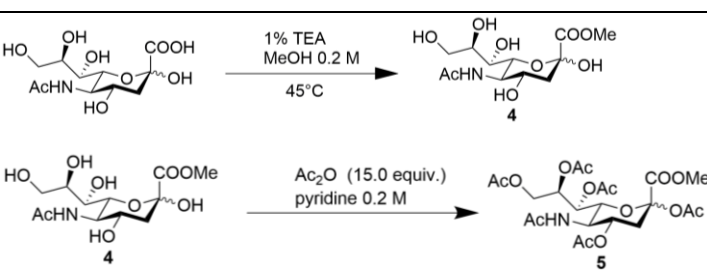
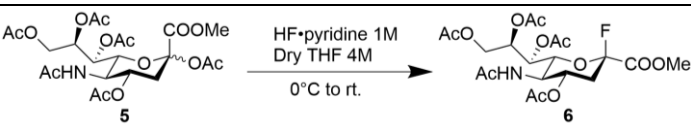
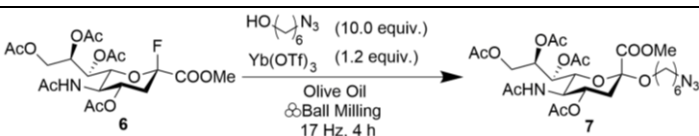
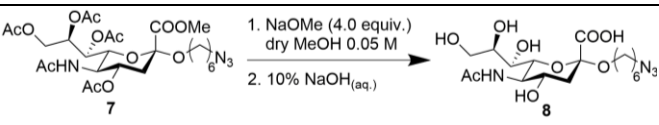
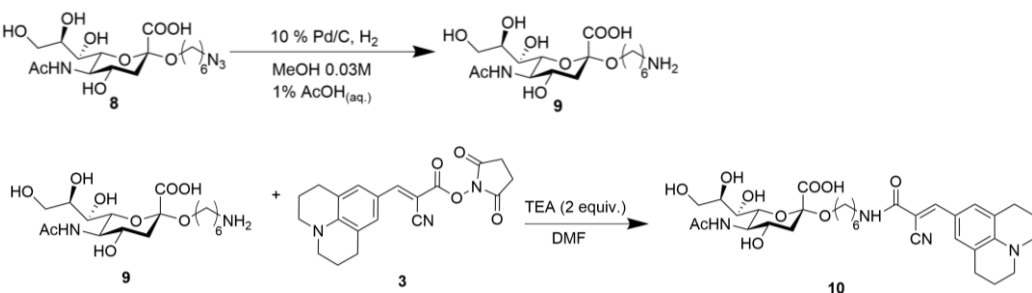
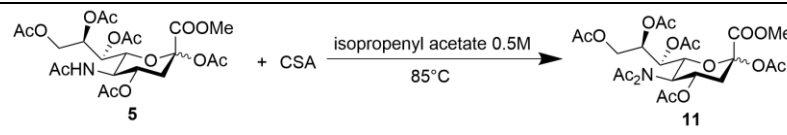
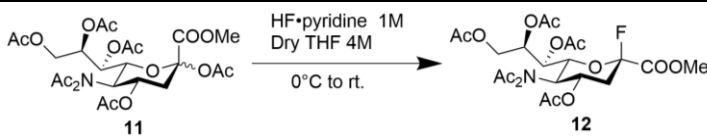
項次2

使用 Anisaldehyde Sulfuric Acid 作為著色劑
展開液極性：EA/Hexanes+MeOH = 2/1+2.5%
(圖片由作者於實驗室拍攝)

四、各步驟產率

以下為本實驗中合成 CCVJ-Sia (化合物10) 與修飾糖官能基的各步驟產率。

項次	反應	產率
1		76%

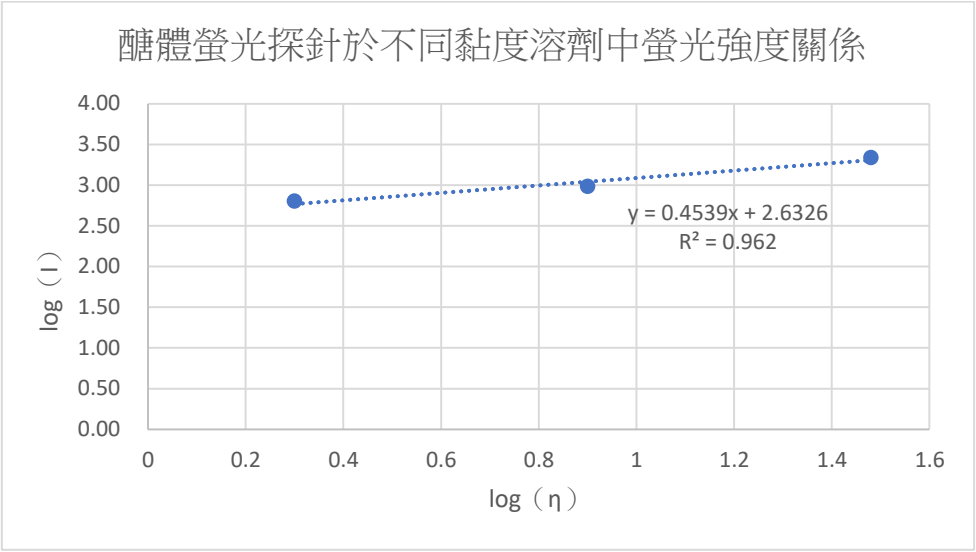
2	 <p>1. NC-CH₂-COOH (1.0 equiv.) dry piperidine (1.0 equiv.) dry ACN 0.1 M, reflux 2. 1 N HCl(aq.)</p>	73%
3	 <p>EDC·HCl (3.0 equiv.) NHS (2.0 equiv.) DMF</p>	79%
4	 <p>1% TEA MeOH 0.2 M 45°C Ac₂O (15.0 equiv.) pyridine 0.2 M</p>	兩步 79%
5	 <p>HF·pyridine 1M Dry THF 4M 0°C to rt.</p>	61%
6	 <p>HO(CH₂)₆N₃ (10.0 equiv.) Yb(OTf)₃ (1.2 equiv.) Olive Oil Ball Milling 17 Hz, 4 h</p>	10%
7	 <p>1. NaOMe (4.0 equiv.) dry MeOH 0.05 M 2. 10% NaOH(aq.)</p>	71%
8	 <p>10% Pd/C, H₂ MeOH 0.03M 1% AcOH(aq.) TEA (2 equiv.) DMF</p>	兩步 36%
9	 <p>CSA isopropenyl acetate 0.5M 85°C</p>	69%
10	 <p>HF·pyridine 1M Dry THF 4M 0°C to rt.</p>	70%

(以上圖片由作者繪製)

五、醣體螢光探針（化合物10）於不同黏度溶劑中螢光強度之差異

	溶劑一	溶劑二	溶劑三
溶劑中甘油與水的比例 (甘油：水)	2:1	1:1	1:2
溶劑黏度 η (cP)	945	30	8
波長(nm)	503.8	504.2	503.2
相對強度I	2166	954.4	629.5
$\log(\eta)$	1.48	0.9	0.3
$\log(I)$	3.34	2.98	2.80

（表一）不同比例甘油與水的溶劑中測得醣體螢光探針的螢光強度數值（表格由作者製作）

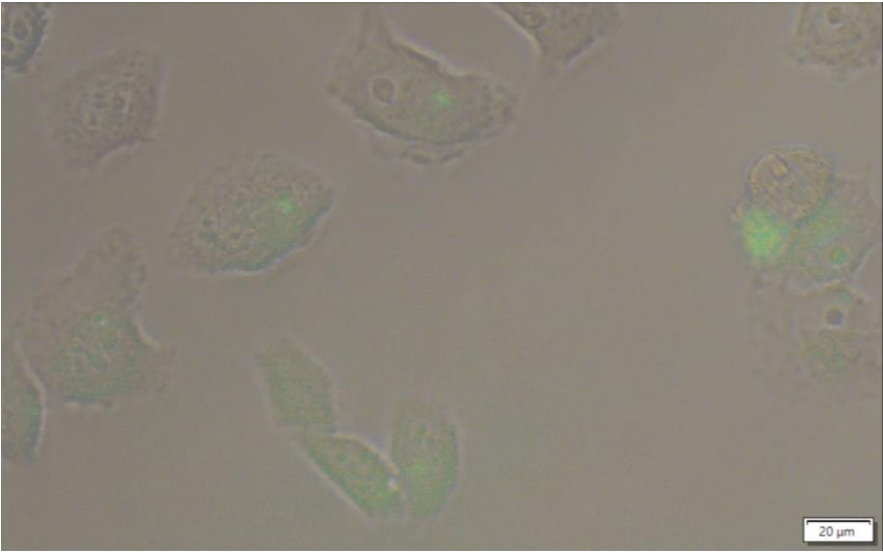


（圖二）醣體螢光探針溶於混有不同比例甘油與水的溶劑中測得的螢光強度差異

（表格由作者製作）

六、檢視醣體螢光探針應用於細胞實驗之成效：

為確認合成出的探針是否達到預期的螢光效果，進行細胞實驗後拍攝獲得圖三：



（圖片委由實驗室研究生於細胞實驗進行時拍攝）

(圖三)於觀察條件放大倍率400倍(10倍目鏡 × 40倍物鏡)、激發波長460~495nm 下所拍攝的實驗結果,綠色部分為螢光。

伍、討論

- 一、結果顯示以化合物12為起始物,使用球磨機合成化合物13的產率較以化合物6為起始物合成化合物7者稍差,推測因為醣體5號碳上的官能基由 NHAc 改成 NAc2 時降低氫鍵的影響,使反應性提升,從而提升產率。
- 二、結果顯示當反應試劑當量數較高時,產率也隨之提升,從3當量提升至10當量,產率由17%提升至28%,此結果符合勒沙特列定理。
- 三、結果顯示在以化合物12為起始物,使用球磨機合成化合物14時,反應條件 2 h, 17 Hz 下,產率15.4%,大於反應條件為球磨機先運轉1.5 h,停機休息10分鐘,再運轉1.5 h, 17 Hz 的產率3%。根據實驗室學長先前使用球磨機合成相關經驗,當使用球磨機合成的反應時間一次超過3 h 時,產物多半已完全水解,因此推測此項實驗產率差異來自反應時間過長,使水解的比率提升,降低產率。
- 四、螢光分光光譜儀分析結果顯示,在黏度較大的溶劑中,醣體螢光探針的螢光強度較高。根據 TICT 理論^{1,2},當溶劑黏度較大時,探針分子內部的扭轉運動受限,使其較難形成低能量的 TICT 態。由於 TICT 態無法放出螢光,當其生成受到抑制時,分子會以較高能態發出螢光,因此螢光強度提升。根據 Förster-Hoffmann 方程式: $\log I = C + x \log \eta$ (其中 I 為螢光相對強度, C 和 x 為常數, η 為溶劑黏度),我們的實驗數據在 log-log 座標下呈良好線性關係(圖二),相關係數高達 0.962,顯示螢光強度與黏度呈幕次關係。此結果符合 TICT 理論的推論。
- 五、我們於細胞實驗中使用 HepG2肝癌細胞與 PANC-1胰腺癌細胞做初步實驗測試,圖三中可見綠色螢光的部分皆為 PANC-1細胞,由於 PANC-1細胞上有 Siglecs 受體,而 HepG2 細胞上則否,因此推論我們合成的探針有符合設計的預期,能與 Siglecs 受體結合後使醣體螢光探針的鍵不易產生扭轉,進而產生較強螢光,以達到篩檢目的。
- 六、由細胞實驗結果推測醣體螢光探針應可與人類亮細胞腎癌細胞(renal clear cell carcinoma)上過度表達之 Siglecs 結合,經胞吞進入腎癌細胞內,而此環境將限制探針分子的轉動,根據 TICT 理論,將使我們合成的醣體螢光探針在進入人類亮細胞腎癌細胞後發出螢光,如同醣體螢光探針於黏性大的溶液中被限制轉動時,螢光強度明顯增強,而在其他黏性低處則否,因而我們合成的醣體螢光探針有可能作為檢測人類亮細胞腎癌細胞用途。

陸、結論

- 一、球磨機合成的結果顯示，當醣體官能基氫鍵效應減小時，反應性提升，產率上升。反應試劑當量數較高時，產率也較高。在 2 h, 17 Hz 的條件下，產率較高。
- 二、我們成功依照計畫合成出 CCVJ-Sia，並藉由螢光分光光譜儀分析確認 CCVJ-Sia 在黏性較大的溶劑中，螢光強度較強，符合 TICT 理論。
- 三、本研究符合綠色化學，成功利用球磨機在無溶劑下，合成中間產物。
- 四、我們合成出的醣體螢光探針具備可與 Siglecs 結合的唾液酸，且環境差異能造成螢光強度改變以做檢測用途，期許未來能實際應用在腎臟癌細胞的檢測。

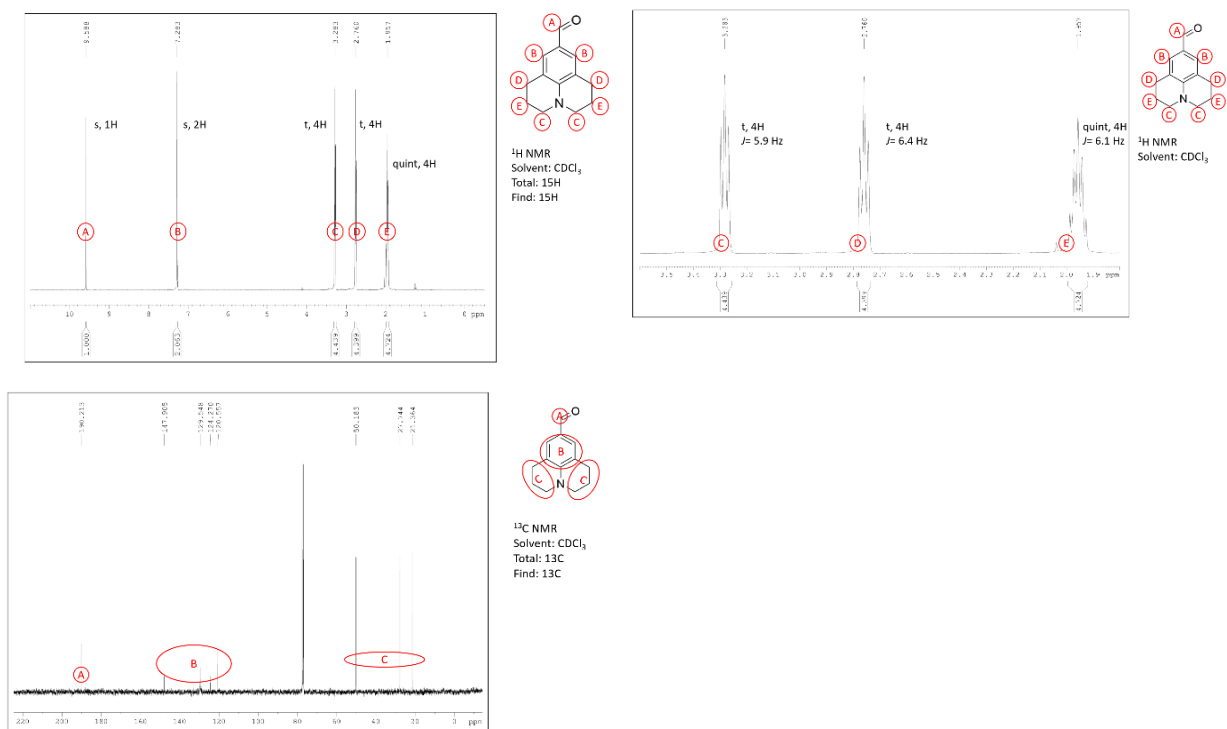
柒、參考文獻資料

1. Sasaki, S., Drummen, G. P. C., & Konishi, G. (2016). Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry. *Journal of Materials Chemistry C*, 4 (14), 2731 – 2743. <https://doi.org/10.1039/C5TC03933A>
2. Chakraborty, N., Silswal, A., & Koner, A. L. (2024). Julolidine-based fluorescent molecular rotor: A versatile tool for sensing and diagnosis. *Sensors & Diagnostics*, 3 (1), 585-598. <https://doi.org/10.1039/D3SD00334E>
3. Zhu, X., Al-Danakh, A., Zhang, L., Sun, X., Jian, Y., Wu, H., Feng, D., Wang, S., & Yang, D. (2022). Glycosylation in Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Clinical Implications. *Cells*, 11 (16), 2598. <https://doi.org/10.3390/cells11162598>
4. Ou, C., Liu, L., Wang, J., Dai, S., Qu, Y., Xiong, Y., Xi, W., Xu, J., & Guo, J. (2017). Enhancement of Siglec-8 expression predicts adverse prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 35 (10), 607.e1 – 607.e8. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.05.016>
5. Takacs, L. (2013). The historical development of mechanochemistry. *Chemical Society Reviews*, 42 (18), 7649 – 7659. <https://doi.org/10.1039/C2CS35442J>
6. Varejão, J. O. S., Varejão, E. V. V., & Fernandes, S. A. (2019). Synthesis and derivatization of julolidine: A powerful heterocyclic structure. *European Journal of Organic Chemistry*, 2019 (29), 5779 – 5791. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900398>
7. Li, P.-J., Ruan, B.-C., Li, Z.-X., & Chang, H.-Y. (2024). Yb (OTf)₃-mediated indirect activation strategy: Stereoselective synthesis of α -sialosides from 2-fluoro sialyl donors. *Chemistry – An Asian Journal*, 19 (22), 2255 – 2262. <https://doi.org/10.1002/asia.202401130>

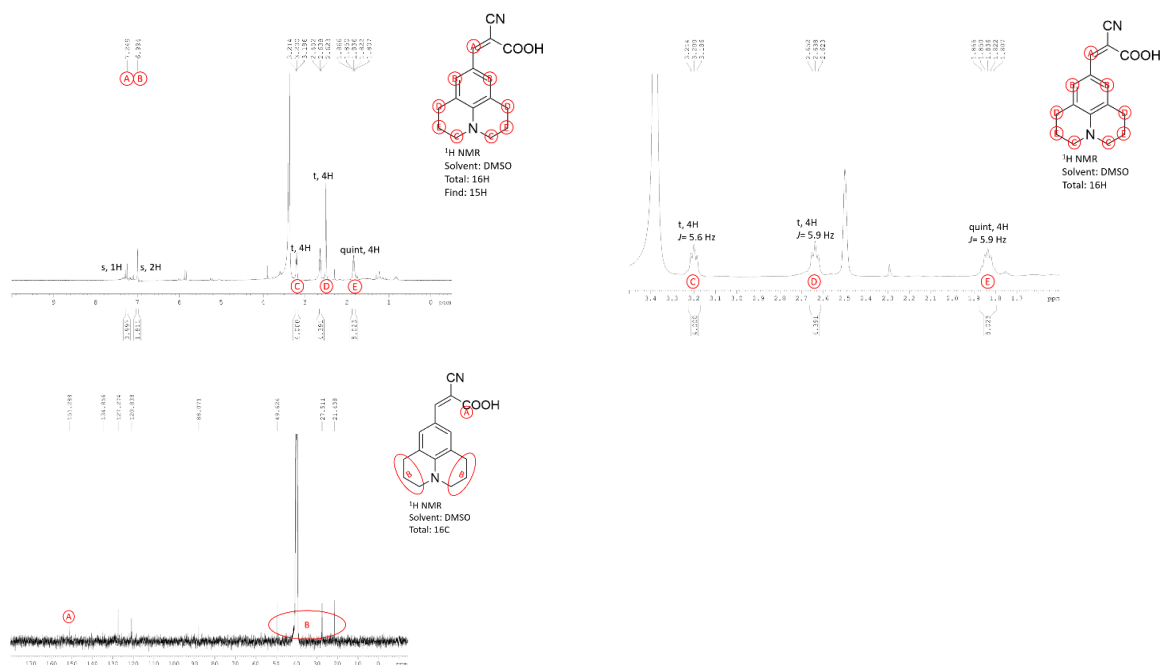
捌、附錄

一、NMR 氫譜、碳譜：(圖譜均來自實驗室 NMR 儀器)

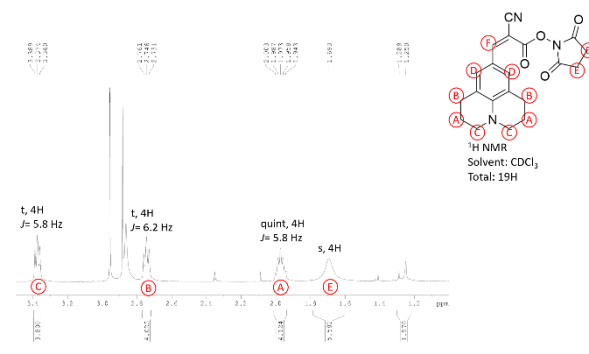
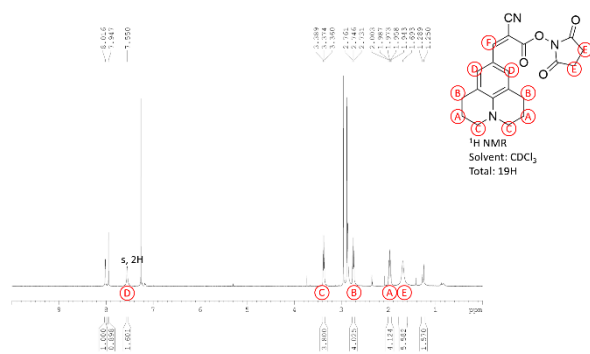
(一) 化合物1



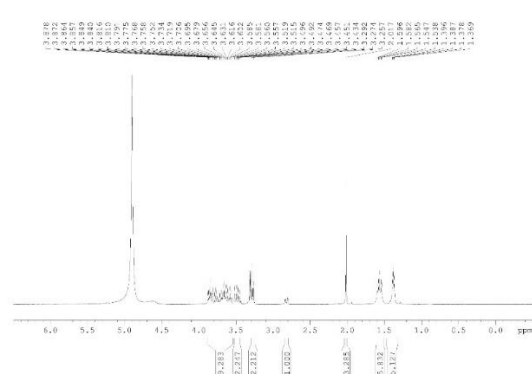
(二) 化合物2



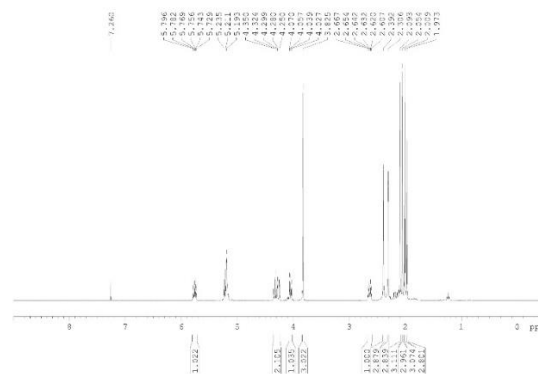
(三) 化合物3



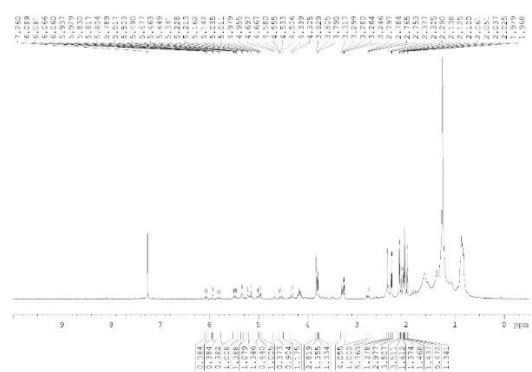
(四) 化合物8



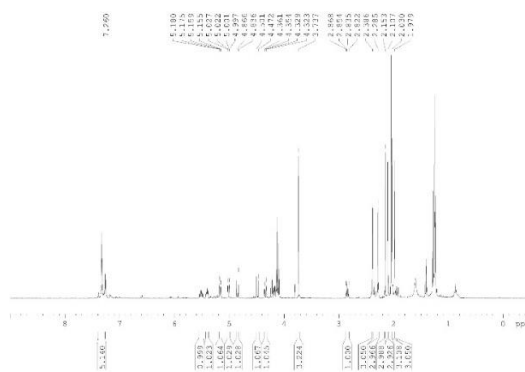
(五) 化合物12



(六) 化合物13

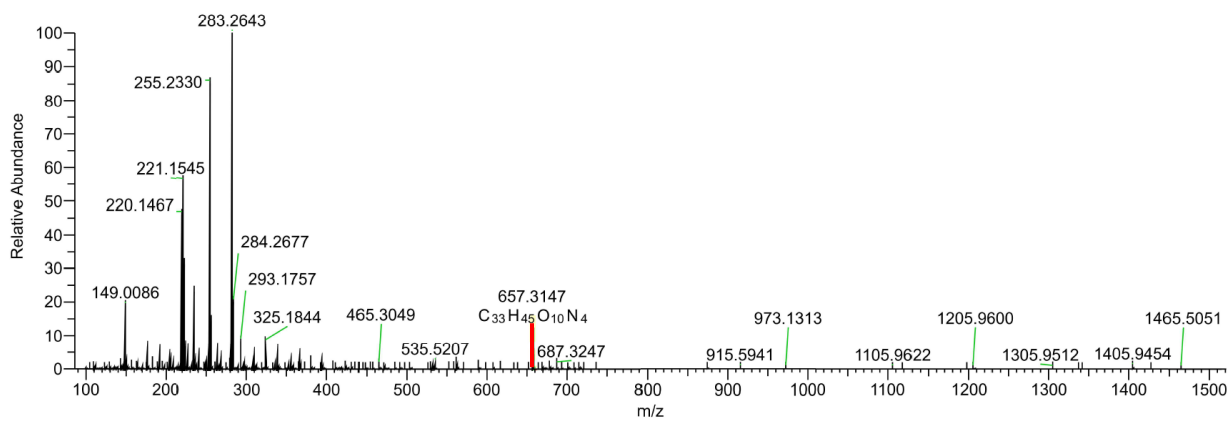


(七) 化合物14



二、醣體螢光探針（化合物10）HRMS ESI 質譜儀資料
（圖譜來自實驗室儀器）

T: FTMS - p ESI sid=35.00 Full ms [100.0000-1500.0000]



Peak Mass	Display For...	S Fit	RDB	Delta [ppm]	Theo. mass	Rank	Combined S...	# Matched I...	# Missed Iso.	MS Cov. [%]	Pattern Cov....	MSMS Matc...
657.3147	C ₃₃ H ₄₅ O ₁₀ N ₄	40.65743559 06997	13.50	2.55	657.31302	1	96.88	3	1	100	99.01	(Collection)

Formula	Calculated Mass	Peak Mass	Mass (ppm)	Difference
C ₃₃ H ₄₅ O ₁₀ N ₄	657.3136	657.3147	0.17	

【評語】 050208

- 一、本研究成功合成 CCVJ-Sia 醣體螢光探針，分析其螢光性質，應用於人類腎臟癌細胞的檢測。實驗利用 Julolidine 和 Sialic acid 作為起始物，發現反應試劑當量數較高、反應時間適中（兩小時）及官能基氫鍵效應減小時，醣基化修飾的產率顯著提高。此外，螢光分光光譜儀的分析顯示，CCVJ-Sia 在高黏度溶劑中的螢光強度增強，證實其在不同環境的檢測能力。合成的探針能有效與腎臟癌細胞表面的 Siglecs 受體結合並產生螢光，顯示其檢測腎臟癌細胞的潛力。
- 二、研究團隊合成一系列化合物，並挑選其中一個進行癌細胞實驗與螢光測試，證實其對腎臟癌細胞具有選擇性。
- 三、研究符合綠色化學原則，在無溶劑條件下，利用球磨機合成中間產物。產物可提供研發腎臟癌的早期檢測方法。

作品海報

合成醣體螢光探針
以用於腎臟癌細胞偵測

壹、摘要

本研究以合成 **CCVJ-Sia 醣體螢光探針**、分析它的螢光性質並用以檢測人類腎臟癌細胞為目的。透過一系列合成實驗，由起始物 Julolidine 與 Sialic acid成功合成醣體螢光探針，並藉螢光分光光譜儀得出其螢光強度與黏度具冪次關係，符合 TICT 理論。我們亦探討改變醣上官能基、不同反應試劑當量數與使用球磨機反應不同時長分別對醣基化修飾產率之影響，發現當反應試劑當量數高、反應時長適中(兩小時)、官能基氫鍵效應減小時，產率較高。此外，透過細胞實驗結果，確認探針能與特定癌細胞上Siglecs受體結合並產生螢光，推論此探針具有檢測腎臟癌細胞的效果。

貳、研究動機

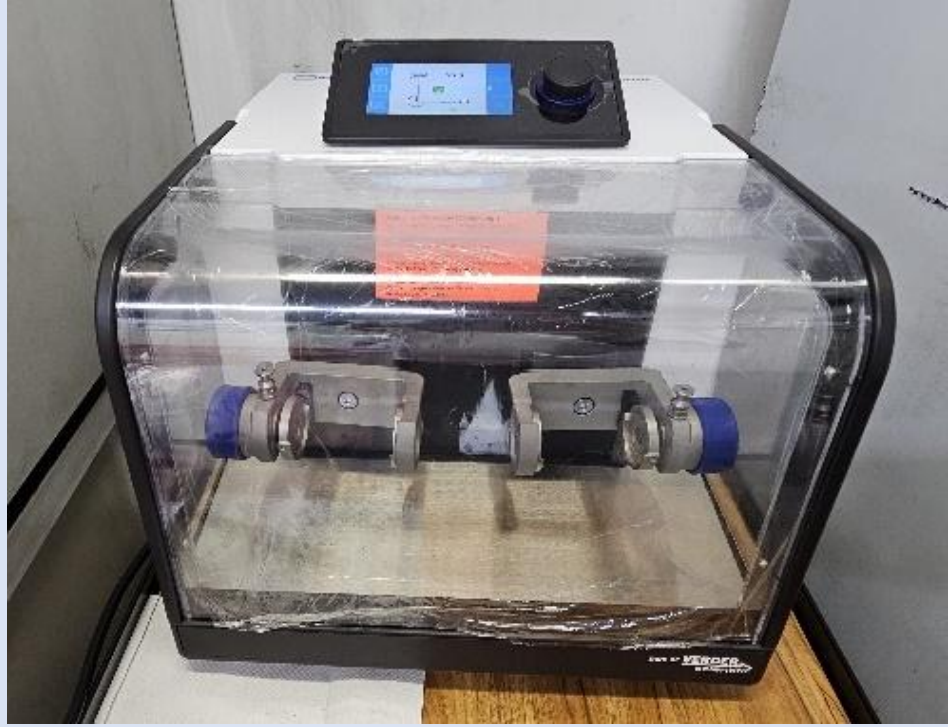
螢光分子被廣泛運用於細胞檢測領域，其中與唾液酸家族組裝而成的**醣體螢光分子**對癌細胞檢測具高專一性。因此我們採用人體常見的*N*-Acetylneuraminic acid 作為醣體，合成醣體螢光探針，並探討其於癌症篩檢之應用。此外，查找文獻發現過往合成過程中**常涉及低溫反應**，有高耗能、操作複雜且耗費大量溶劑的缺點，不符合綠色化學的宗旨。因此我們在參考實驗室學長的新式方法後，嘗試**改以球磨機進行醣基化修飾**，以期符合綠色化學。

參、研究目的

- 一、透過一系列反應合成醣體螢光探針並分析溶劑黏度對探針螢光強度影響
- 二、比較醣上不同官能基對球磨機進行醣基化修飾之產率影響
- 三、探討不同反應物當量數對球磨機進行醣基化修飾之產率影響
- 四、探討不同球磨機反應時間球磨機合成產率的影響
- 五、檢視醣體螢光探針應用於細胞檢測的成效

肆、研究設備與器材

中量快速球磨機MM400：

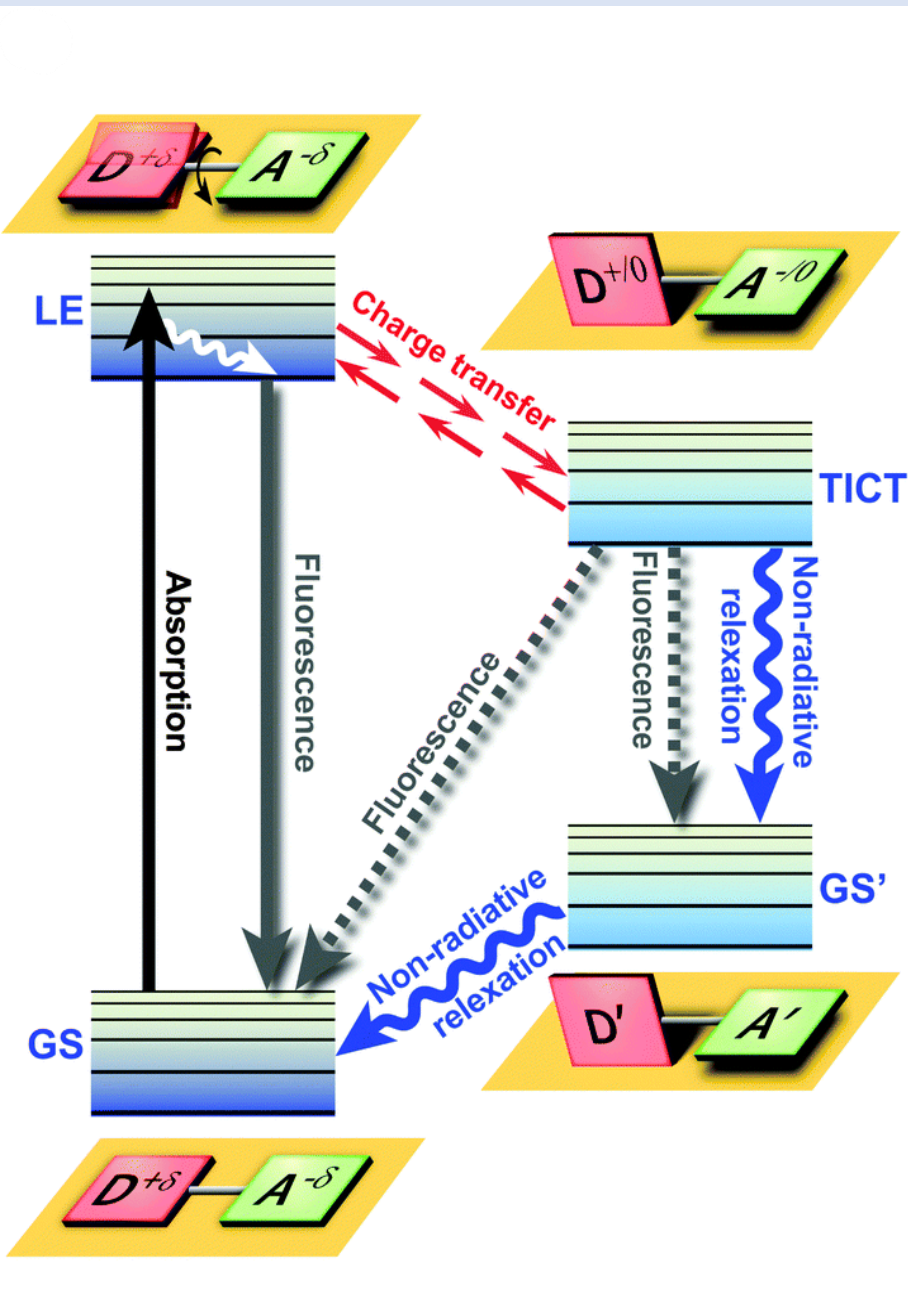


球磨罐(材質為ZrO₂)：



伍、文獻探討

醣體螢光探針螢光發光機制：



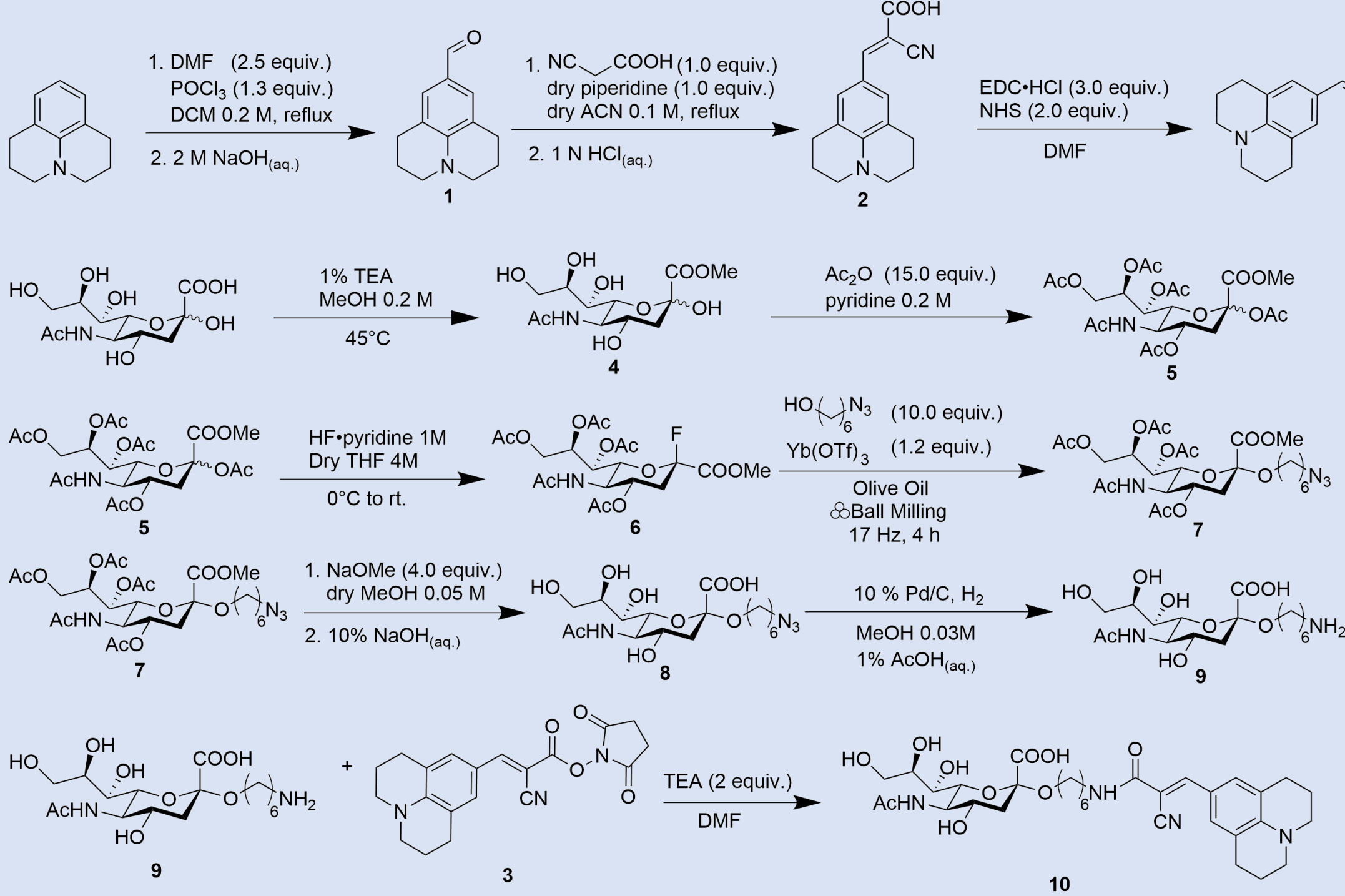
扭曲內分子電荷轉移(Twisted Intramolecular Charge Transfer, **TICT**)，指分子內的電子供體（donor）與電子受體（acceptor）之間存在可旋轉的單鍵時，因立體構型不同而出現不同能階。當此種分子受光激發到激發態時，電子可能以不同路徑轉移，進而產生螢光。

陸、研究過程與方法

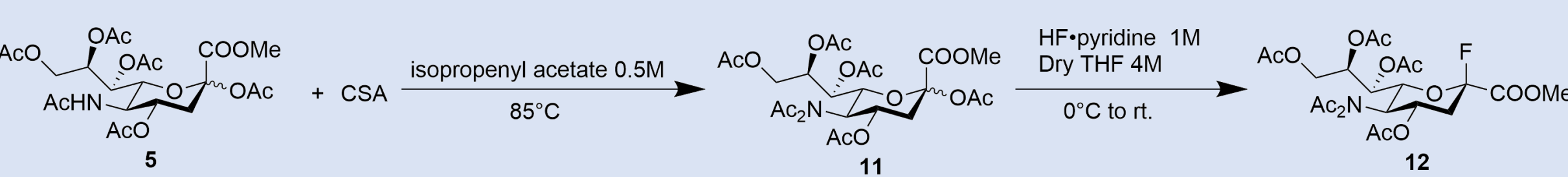
一、合成計畫：

為了合成出CCVJ-Sia醣體螢光探針，以及探討使用球磨機做反應時，醣上修飾的官能基、反應試劑當量數及球磨機反應時長分別對產率影響，設計出以下四個實驗的合成計畫：

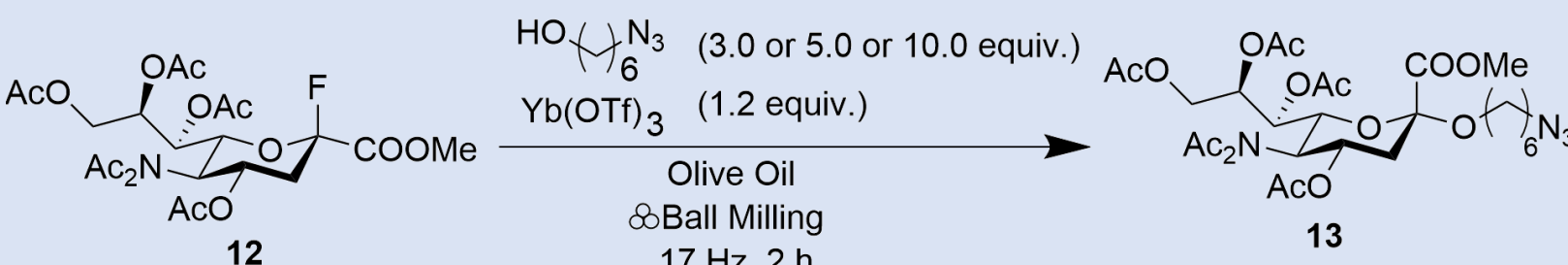
實驗一、合成醣體螢光探針（化合物**10**）



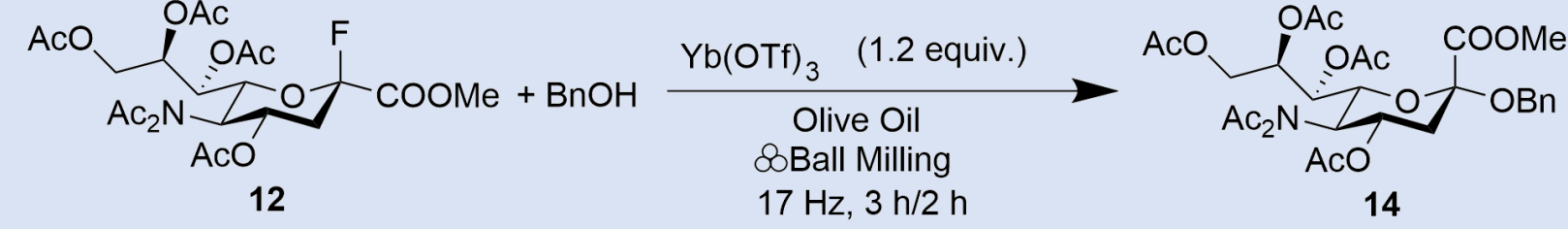
實驗二、改變醣上官能基



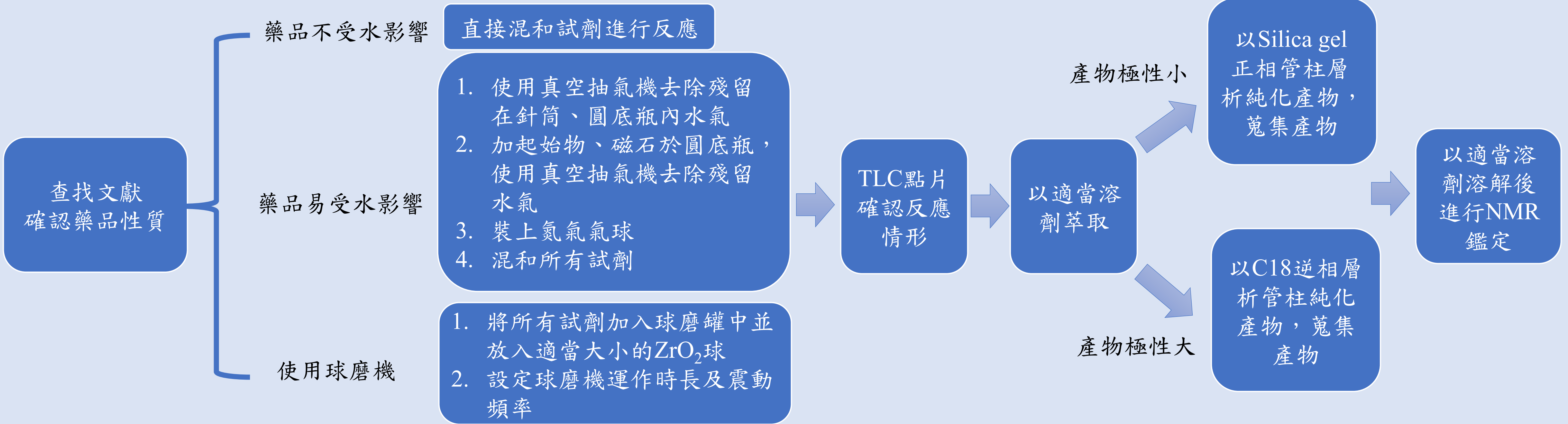
實驗三、改變反應試劑當量數



實驗四、改變球磨機反應時間

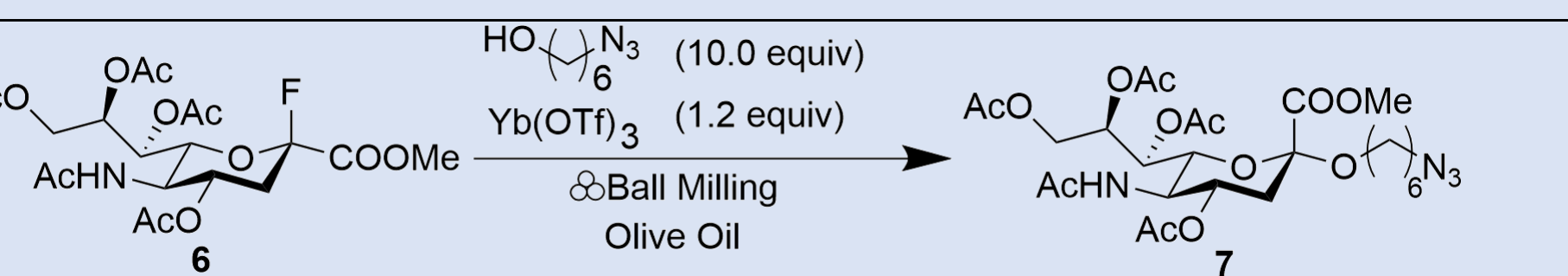
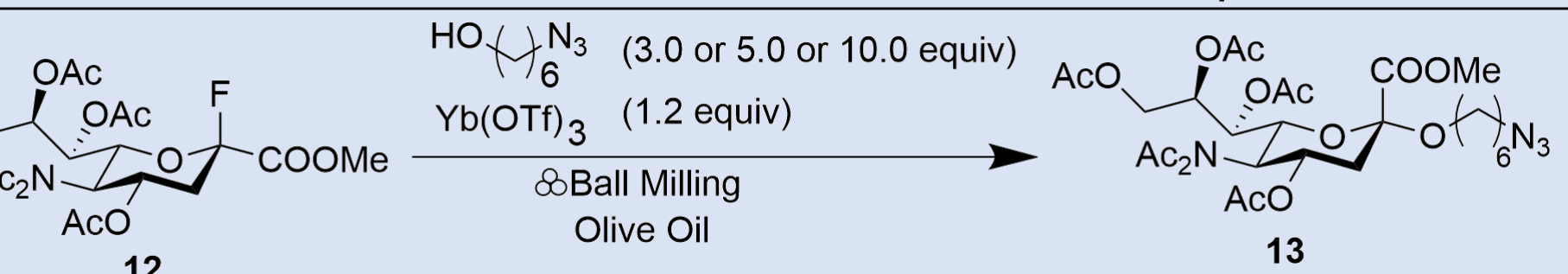


二、操作流程：



柒、研究結果

一、改變醣上官能基對球磨機合成產率影響的結果

5號碳上官能基	反應	產率
NHAc		10%
NAc2		28%

二、改變反應試劑當量數對球磨機合成產率影響的結果

項次	6-疊氨基己醇當量數	化合物13之產率
1	3	17%
2	5	22%
3	10	28%

三、改變反應時間對球磨機合成產率影響的結果

項次	反應時間	化合物14之產率
1	2 h	15%
2	1.5 h → 休息10 min → 1.5 h	3%

產率分析：由TLC結果顯示項次2產物水解較多，產率因而下降
使用 Anisaldehyde Sulfuric Acid 作為著色劑
展開液極性：EA/Hexanes+MeOH = 2/1+2.5%

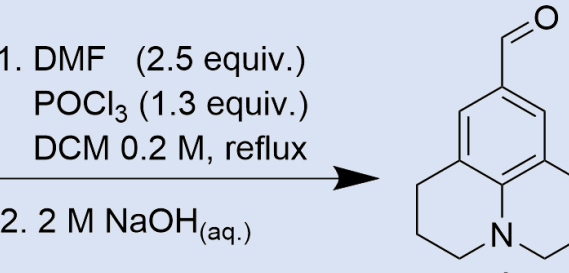
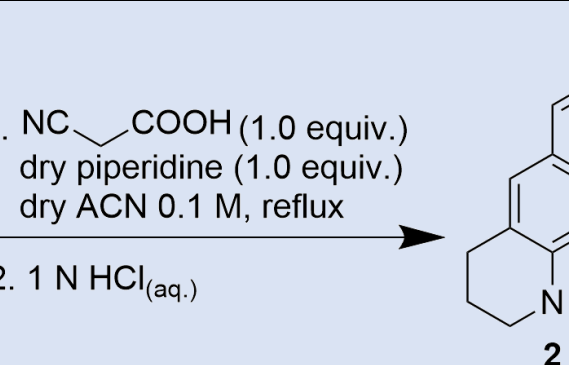
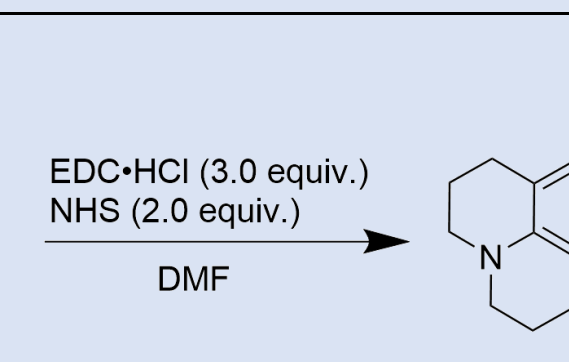
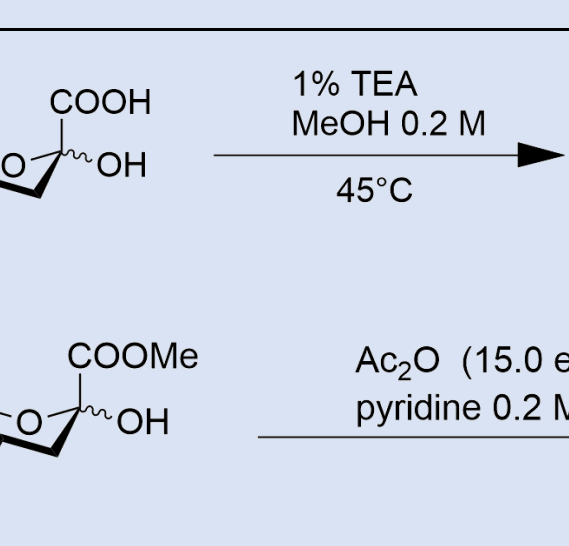
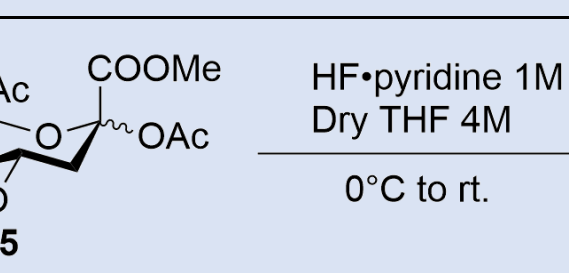
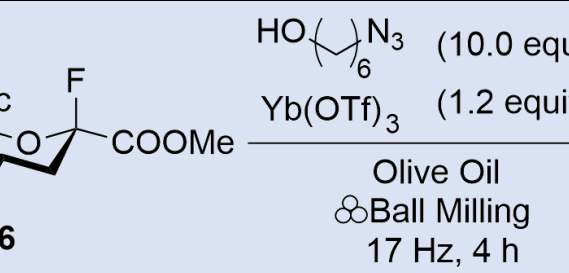
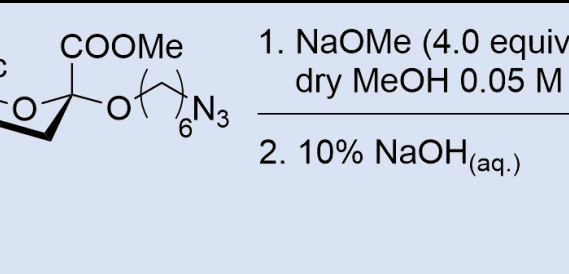
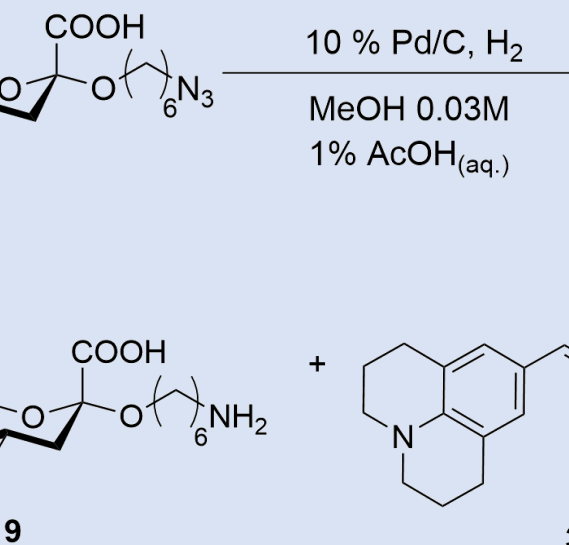
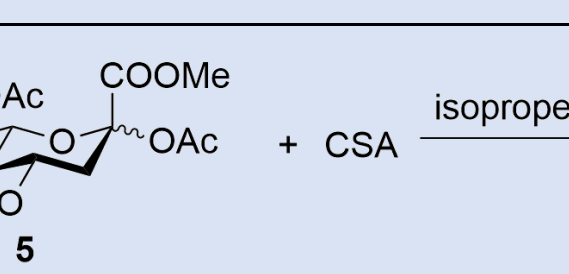
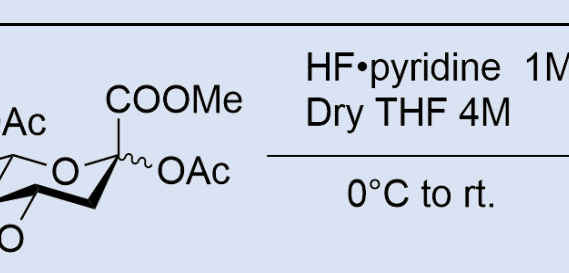


項次1



項次2

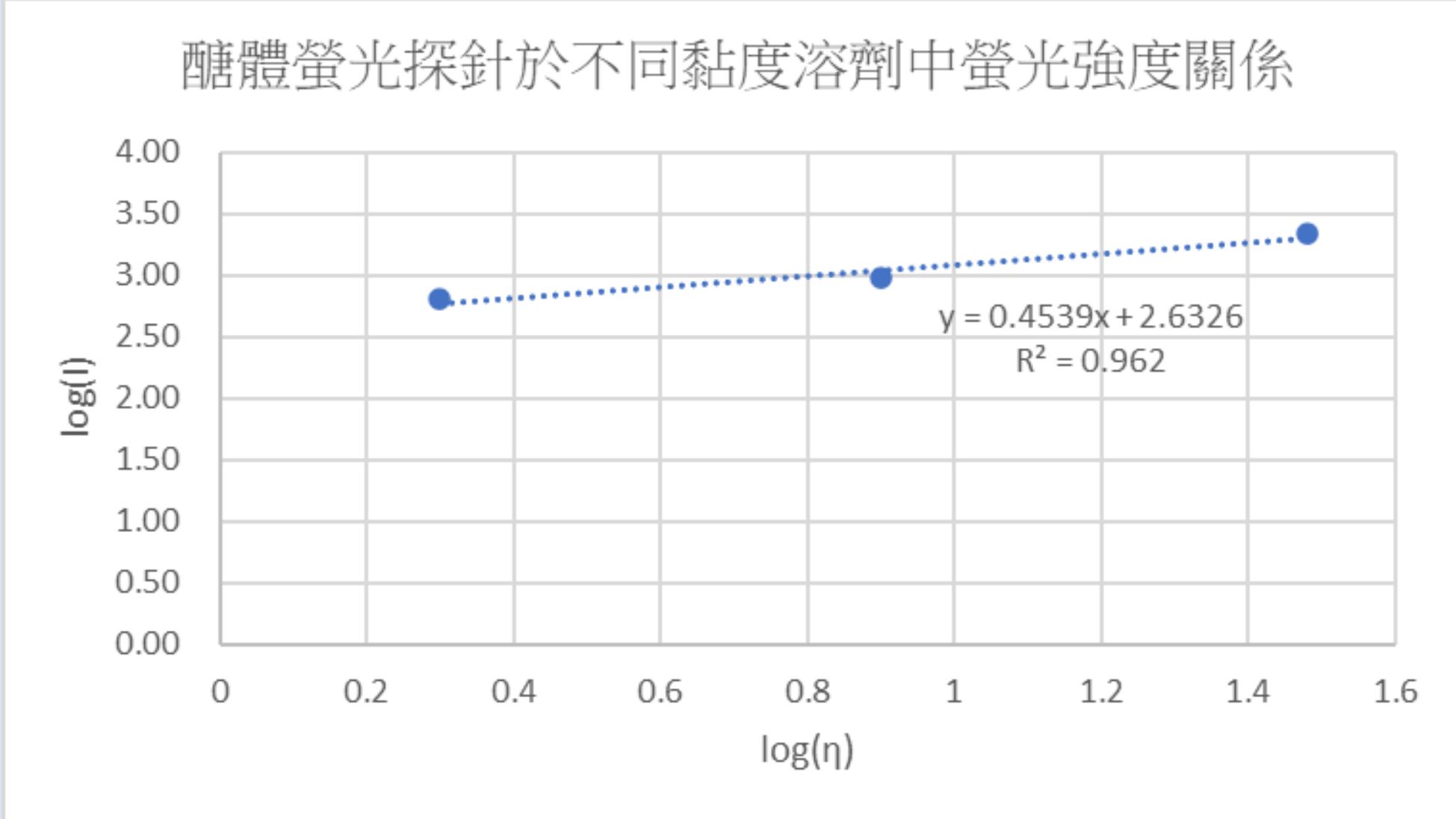
四、合成CCVJ-Sia(化合物10)與修飾醣官能基的各步驟產率

項次	反應	產率
1		76%
2		73%
3		79%
4		兩步 79%
5		61%
6		10%
7		71%
8		兩步 36%
9		69%
10		70%

五、醣體螢光探針(化合物10)於不同黏度溶劑中螢光強度之差異

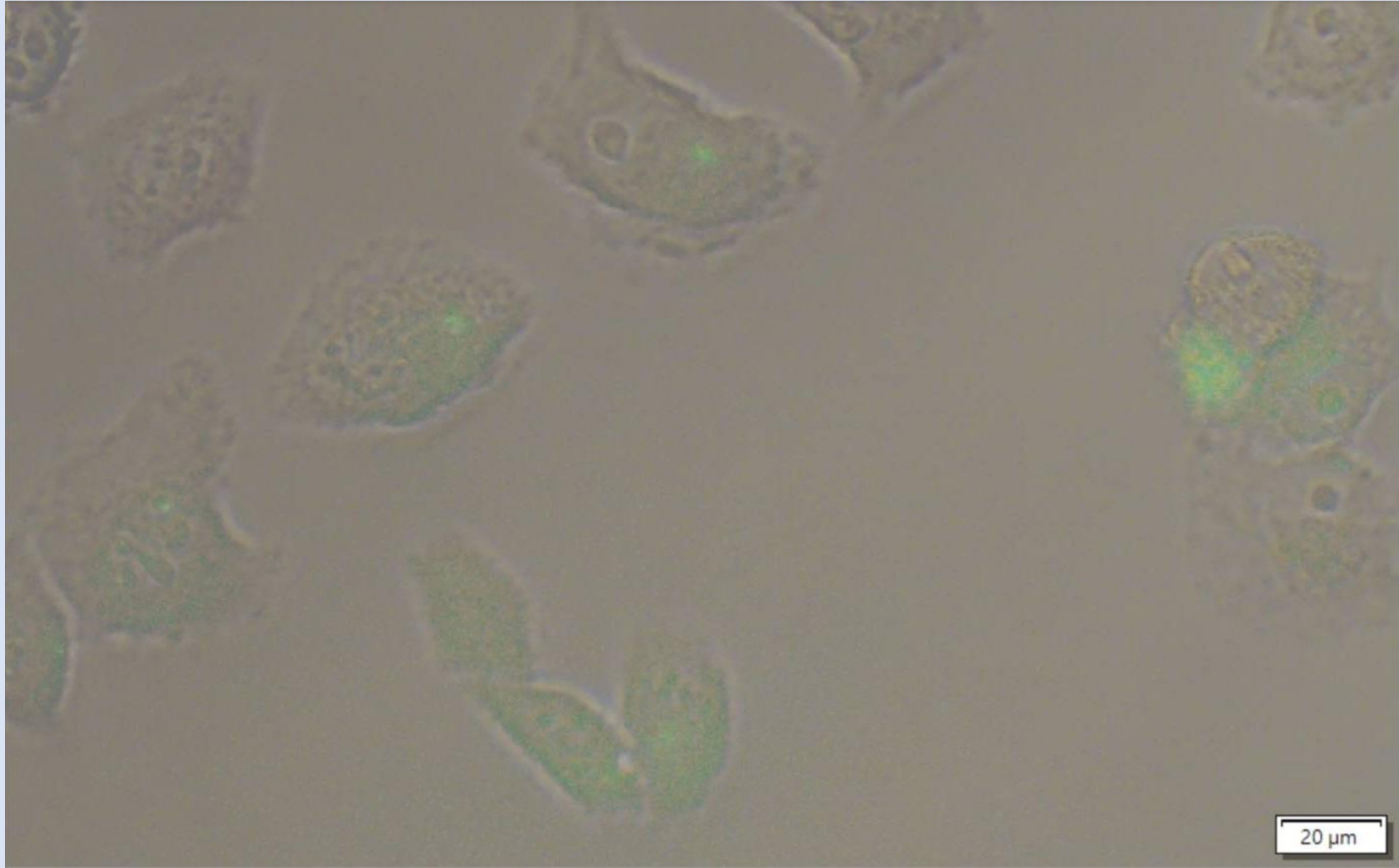
	溶劑一	溶劑二	溶劑三
溶劑中甘油與水的比例 (甘油：水)	2:1	1:1	1:2
溶劑黏度η(cP)	945	30	8
波長(nm)	503.8	504.2	503.2
相對強度I	2166	954.4	629.5
log(η)	1.48	0.9	0.3
log(I)	3.34	2.98	2.80

（表一）不同比例甘油與水的溶劑中測得醣體螢光探針的螢光強度數值



（圖一）醣體螢光探針溶於混有不同比例甘油與水的溶劑中測得的螢光強度差異

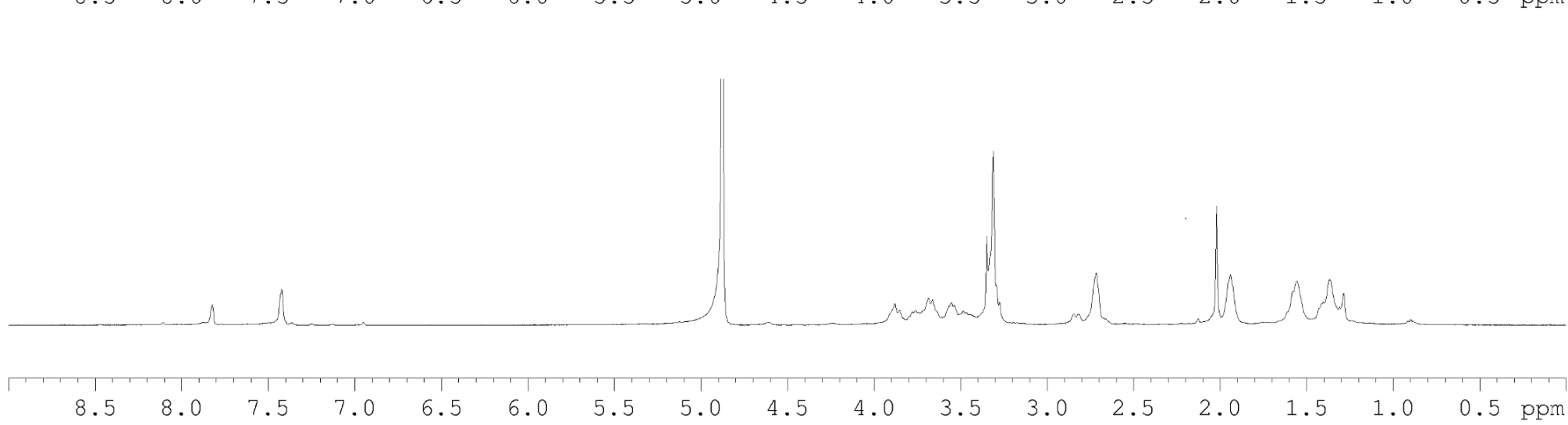
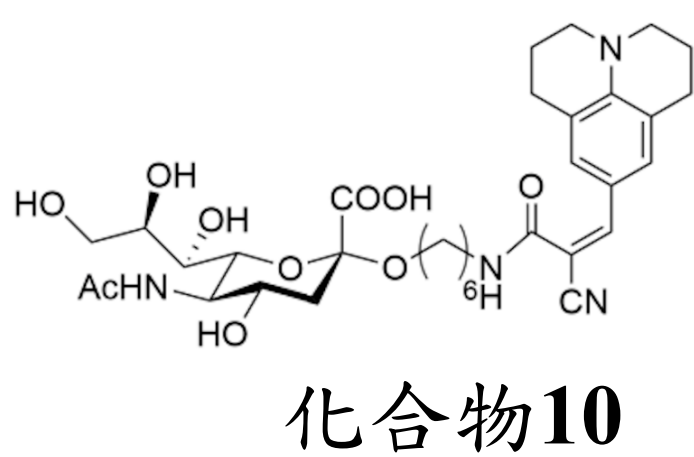
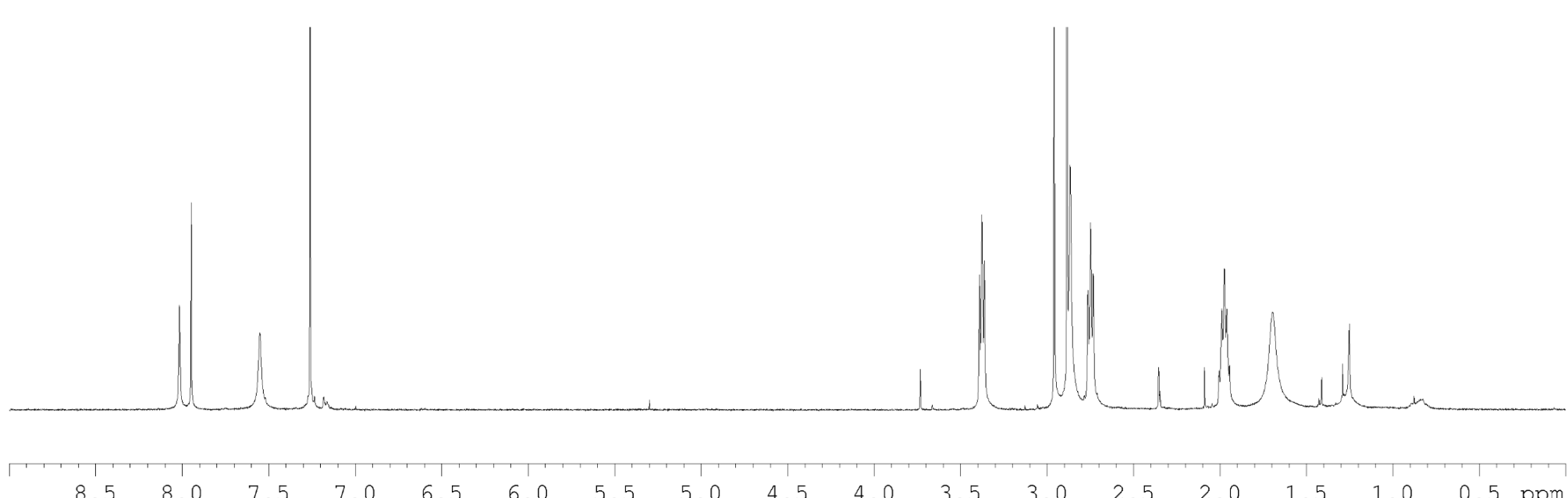
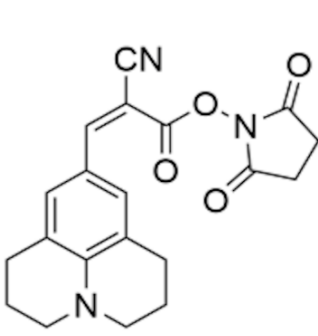
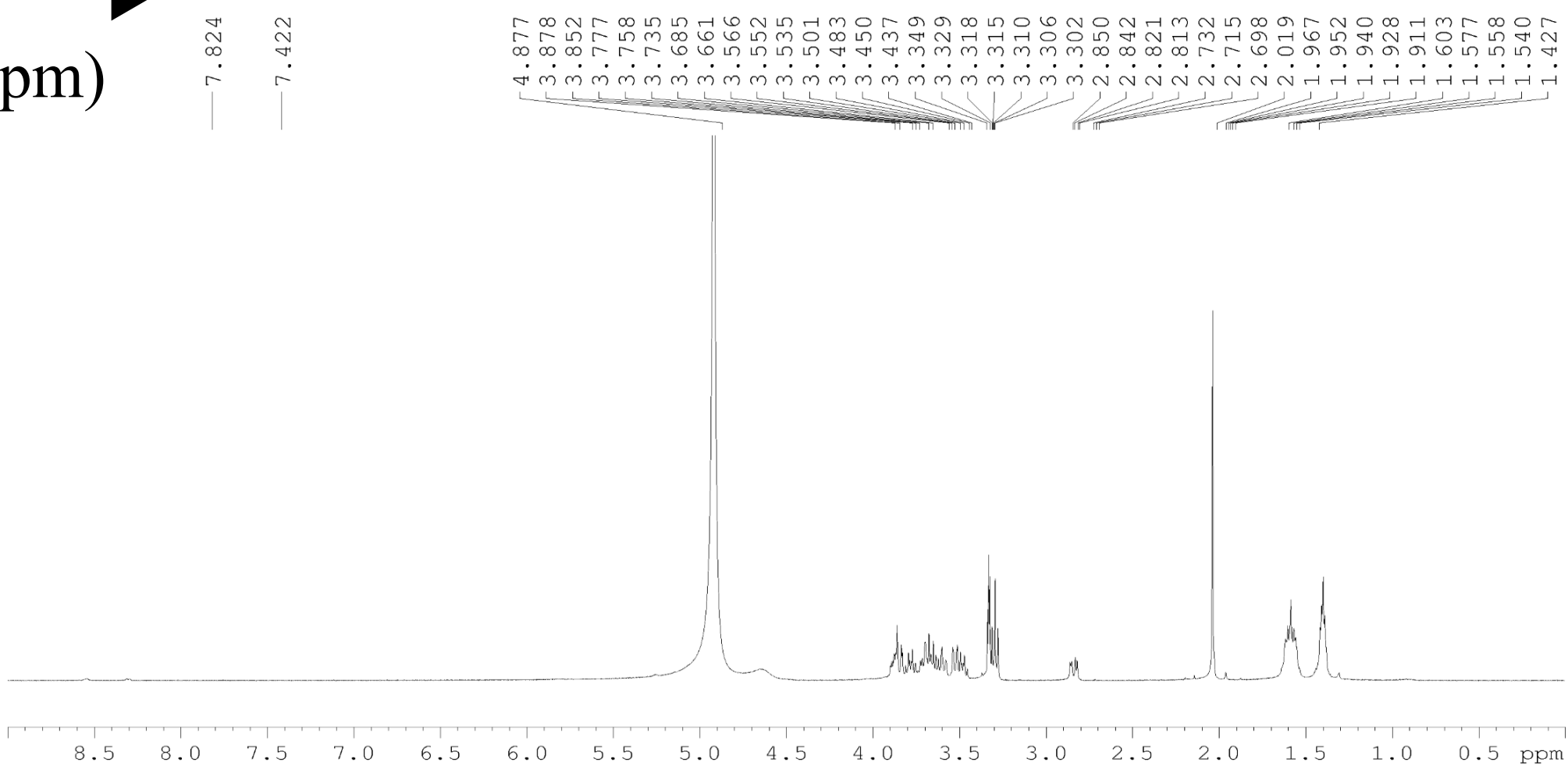
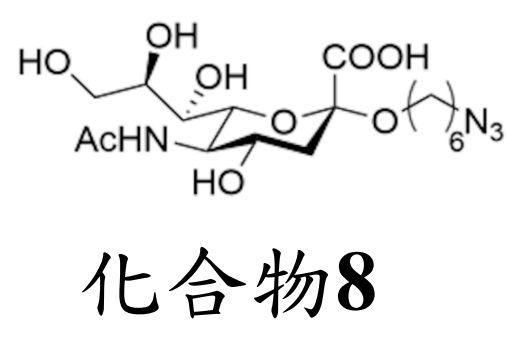
六、檢視醣體螢光探針應用於細胞實驗之成效



（圖二）於觀察條件放大倍率400倍（10倍目鏡×40倍物鏡）、激發波長460~495nm下所拍攝的實驗結果，綠色部分為螢光。

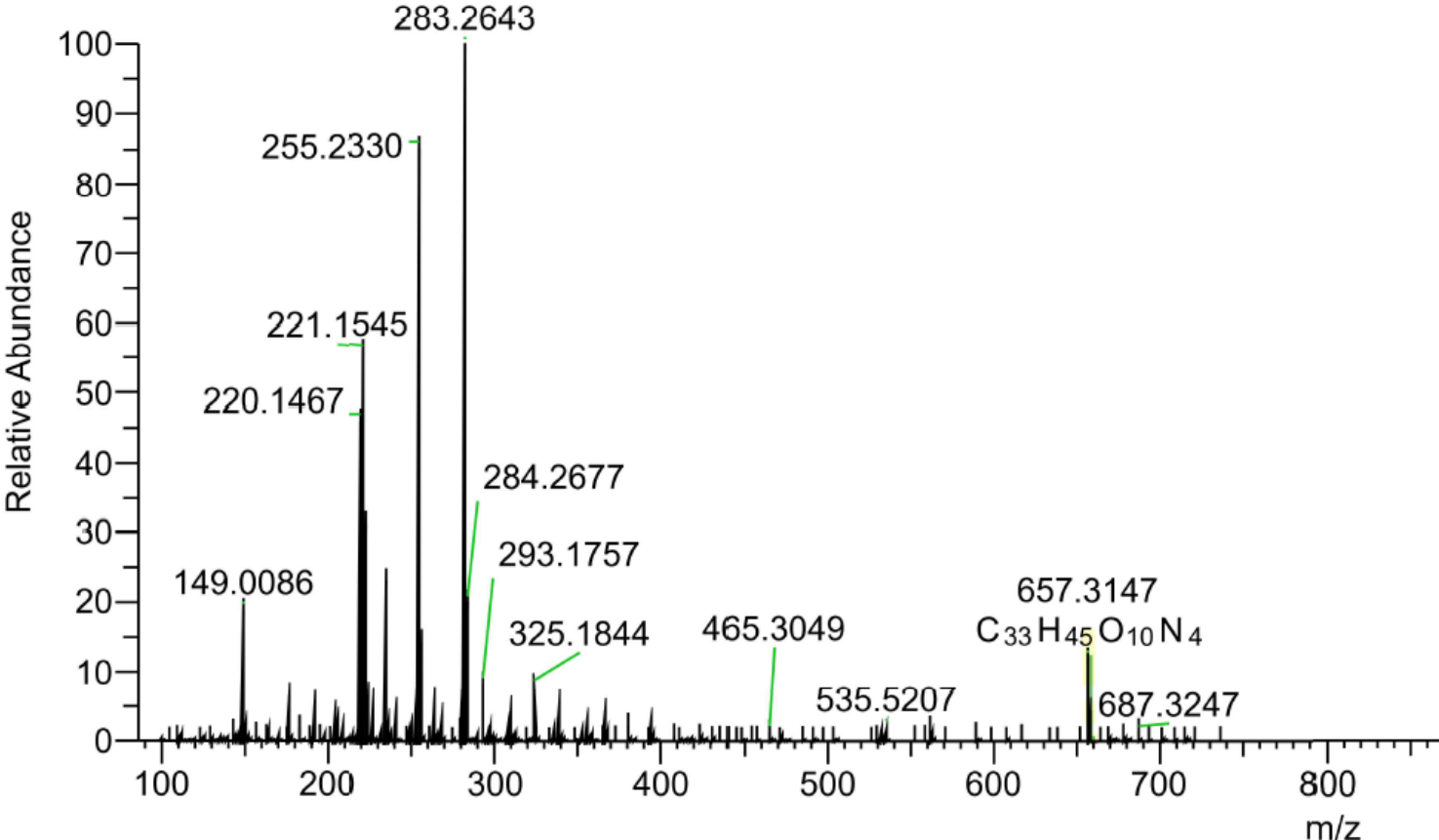
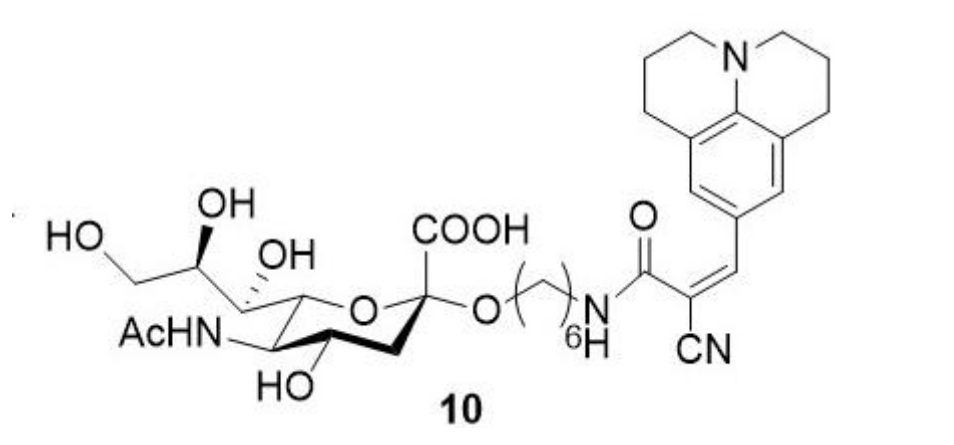
七、¹H NMR 鑑定結果：

CCVJ-Sia之峰值(ppm)



八、醣體螢光探針(化合物10)HRMS ESI質譜儀資料

FTMS - p ESI sid=35.00 Full ms [100.0000-1500.0000]

Peak Mass	Display For...	S Fit	RDB	Delta [ppm]	Theo. mass	Rank	Combined S...	# Matched I...	# Missed Iso...	MS Cov. [%]	Pattern Cov...	MSMS Matc...
657.3147	C ₃₃ H ₄₅ O ₁₀ N ₄	40.65743559 06997	13.50	2.55	657.31302	1	96.88	3	1	100	99.01	(Collection)

Formula	Calculated Mass	Peak Mass	Mass Difference(ppm)
C ₃₃ H ₄₅ O ₁₀ H ₄	657.3136	657.3147	0.17

捌、討論

- 一、結果顯示以化合物12為起始物，使用球磨機合成化合物13的產率較以化合物6為起始物合成化合物7者稍差，推測因為醣體5號碳上的**官能基由NHAc改成NAc2**時**降低氫鍵的影響**，使反應性提升，從而提升產率。
- 二、結果顯示當**反應試劑當量數較高**時，產率也隨之提升，從3當量提升至10當量，產率由17%提升至28%，此結果符合**勒沙特列定理**。
- 三、結果顯示在以化合物12為起始物，使用球磨機合成化合物14時，**反應條件 2 h, 17 Hz**下，產率15%，大於反應條件為球磨機先運轉1.5 h，停機休息10分鐘，再運轉1.5 h, 17 Hz的產率3%。根據實驗室學長先前使用球磨機合成相關經驗，當使用球磨機合成的反應時間一次超過3 h時，產物多半已完全水解。因此推測此項實驗產率差異來自**反應時間過長**，使**水解的比率提升**，降低產率。
- 四、螢光分光光譜儀分析結果顯示，在**黏度較大的溶劑**中，醣體螢光探針的**螢光強度較高**。根據 TICT 理論，當溶劑黏度較大時，探針分子內部的扭轉運動受限，使其較難形成低能量的 TICT 態。由於 TICT 態無法放出螢光，當其生成受到抑制時，分子會以較高能態發出螢光，因此螢光強度提升。根據 Förster–Hoffmann 方程式： $\log I = C + x \log \eta$ （其中I為螢光相對強度，C和x為常數， η 為溶劑黏度），我們的實驗數據在 log-log 座標下呈良好線性關係，相關係數高達 0.962，顯示螢光強度與黏度呈冪次關係。此結果符合 TICT 理論的推論。
- 五、我們於細胞實驗中使用HepG2肝癌細胞與PANC-1胰腺癌細胞做初步實驗測試，圖三中可見綠色螢光的部分皆為PANC-1細胞，由於PANC-1細胞上有Siglecs受體，而HepG2細胞上則否，因此推論我們合成的探針有符合設計的預期，**能與Siglecs受體結合**後使醣體螢光探針的鍵不易產生扭轉，進而**產生較強螢光**，以達到篩檢目的。
- 六、由細胞實驗結果推測醣體螢光探針應可與人類亮細胞腎癌細胞(renal clear cell carcinoma)上過度表達之Siglecs結合，經胞吞進入腎癌細胞內，而此環境將限制探針分子的轉動，根據TICT理論，將使我們合成的醣體螢光探針在進入人類亮細胞腎癌細胞後發出螢光，如同醣體螢光探針於黏性大的溶液中被限制轉動時，螢光強度明顯增強，而在其他黏性低處則否，因而我們合成的醣體螢光探針有可能作為檢測人類亮細胞腎癌細胞用途。

玖、結論

- 一、球磨機合成的結果顯示，當醣體官能基氫鍵效應減小時，反應性提升，產率上升。反應試劑當量數較高時，產率也較高。在2 h, 17 Hz的條件下，產率較高。
- 二、我們成功依照計畫合成出CCVJ-Sia，並藉由螢光分光光譜儀分析確認CCVJ-Sia在黏性較大的溶劑中，螢光強度較強，符合TICT理論。
- 三、本研究符合綠色化學，成功利用球磨機在無溶劑下，合成中間產物。
- 四、我們合成出的醣體螢光探針具備可與Siglecs結合的唾液酸，且環境差異能造成螢光強度改變以做檢測用途，期許未來能實際應用在腎臟癌細胞的檢測。

拾、參考文獻

1.Sasaki, S., Drummen, G. P. C., & Konishi, G. (2016). Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry. *Journal of Materials Chemistry C*, 4(14), 2731–2743. <https://doi.org/10.1039/C5TC03933A>

2.Chakraborty, N., Silswal, A., & Koner, A. L. (2024). Julolidine-based fluorescent molecular rotor: A versatile tool for sensing and diagnosis. *Sensors & Diagnostics*, 3(1), 585-598. <https://doi.org/10.1039/D3SD00334E>

3.Zhu, X., Al-Danakh, A., Zhang, L., Sun, X., Jian, Y., Wu, H., Feng, D., Wang, S., & Yang, D. （2022）. Glycosylation in Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Clinical Implications. *Cells*, 11（16）, 2598. <https://doi.org/10.3390/cells11162598>

4.Ou, C., Liu, L., Wang, J., Dai, S., Qu, Y., Xiong, Y., Xi, W., Xu, J., & Guo, J. (2017). Enhancement of Siglec-8 expression predicts adverse prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 35(10), 607.e1–607.e8. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.05.016>

5.Takacs, L. (2013). The historical development of mechanochemistry. *Chemical Society Reviews*, 42(18), 7649–7659. <https://doi.org/10.1039/C2CS35442J>

6.Varejão, J. O. S., Varejão, E. V. V., & Fernandes, S. A. (2019). Synthesis and derivatization of julolidine: A powerful heterocyclic structure. *European Journal of Organic Chemistry*, 2019(29), 5779–5791. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900398>

7.Li, P.-J., Ruan, B.-C., Li, Z.-X., & Chang, H.-Y. (2024). Yb(OTf)₃-mediated indirect activation strategy: Stereoselective synthesis of α-sialosides from 2-fluoro sialyl donors. *Chemistry – An Asian Journal*, 19(22), 2255–2262. <https://doi.org/10.1002/asia.202401130>

8.Shirakawa, A., Manabe, Y., Marchetti, R., Yano, K., Masui, S., Silipo, A., Molinaro, A., & Fukase, K. (2021). Chemical synthesis of sialyl N-glycans and analysis of their recognition by neuraminidase. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(46), 24686–24693. <https://doi.org/10.1002/anie.202111035>