

# 水溶性 $C_{60}$ 衍生物合成

赵 强 贺继东\* 郭红革 陈滇宝

(青岛科技大学高分子科学与工程学院 青岛 266042)

**摘 要**  $C_{60}$  具有生物活性, 可用于光动力学治疗和抑制人体免疫缺损病毒酶 HIVP 的活性等方面, 因此引起了生物学家和药学家的兴趣。但由于  $C_{60}$  在水中几乎不溶, 阻碍了对其生物活性的研究, 因此合成水溶性  $C_{60}$  衍生物对于考察  $C_{60}$  的生物活性具有重要意义。本文综述了近年来水溶性  $C_{60}$  衍生物合成的研究进展。

**关键词**  $C_{60}$  富勒烯 水溶性  $C_{60}$  衍生物 合成

## Progress in Preparation of Water-soluble $C_{60}$ Derivatives

Zhao Qiang, He Jidong, Guo Hongge, Chen Dianbao

(College of Polymer Science and Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042)

**Abstract**  $C_{60}$  exhibits an interesting range of biological activities, especially promising in the field of anti-HIV activity, photo dynamic therapy etc. So its biological activities have attracted interest of biologists and pharmacologists. But its low solubility in water hampers the research of its biological activities. This paper reviews the progress in the preparation of some water-soluble  $C_{60}$  derivatives.

**Key words**  $C_{60}$ , Fullerene, Water-soluble  $C_{60}$  derivatives, Preparation

自 1985 年 Kroto 等发现  $C_{60}$  至今已有 17 年的时间, 在超导、磁学、光学、催化、高分子等领域  $C_{60}$  的研究已取得了令人瞩目的成绩。 $C_{60}$  结构特殊, 可以进行 Diels-Alder 反应、Bingel 反应等, 是药物设计的理想基体。 $C_{60}$  及某些  $C_{60}$  衍生物的面积与人体免疫缺损病毒 HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1) 的活性中心的孔穴大小相近, 有可能堵住洞口, 切断病毒的营养供给, 抑制人体免疫缺损病毒酶 HIVP (The Protease of the Human Immunodeficiency Virus-1) 的活性<sup>[1,2]</sup>。另外,  $C_{60}$  通过光诱导产生单重态氧的效率高达 100%, 而单重态氧具有极高的反应活性, 可以杀死癌细胞, 因此  $C_{60}$  可用于光动力学治疗<sup>[3]</sup>。近年来某些  $C_{60}$  衍生物的发现已引起了生物学家和药物学家的兴趣。但由于  $C_{60}$  仅溶于一些非极性和弱极性的有机溶剂, 如甲苯、苯、二硫化碳等, 在水中不溶, 而生物体系都是水溶液体系, 为了探索其生物活性, 首先要增加其在水中的溶解度, 因此合成水溶性的  $C_{60}$  衍生物对其在生物医学领域的应用具有非常重要的意义。

### 1 利用超分子化学方法改善 $C_{60}$ 的水溶性

#### 1.1 $C_{60}$ 与 $\gamma$ -环糊精、杯芳烃形成水溶性包结复合物

利用孔腔大小合适的客体分子  $\gamma$ -环糊精、杯芳烃等同  $C_{60}$  进行包结, 形成主客体超分子体系

赵 强 男, 23 岁, 硕士生, 现从事水溶性  $C_{60}$  衍生物合成的研究。\*联系人

2001-12-10 收稿, 2002-03-26 修回

的包结复合物,是改善  $C_{60}$  水溶性的有效途径之一。

水溶液中利用超分子化学的方法形成的环糊精超分子由于可用于生物医药领域,因此引起了科学家极大的兴趣。如通过非极性的药物分子与环糊精形成包结复合物,可使其溶于水。环糊精(Cyclodextrins, 简称 CD)是一类由 D-吡喃型葡萄糖通过 $\alpha$ -1, 4 糖苷键连接而成的一种环状低聚糖(图 1), 常见的有 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 三种类型。其中 $\alpha$ -CD(空穴直径  $5\sim6\text{\AA}$ )和 $\beta$ -CD( $7\sim8\text{\AA}$ ), 由于空穴太小,不易识别  $C_{60}$  分子(直径  $7.1\text{\AA}$ ), 只有 $\gamma$ -CD( $9\sim10\text{\AA}$ )易与  $C_{60}$  形成包结复合物。1992 年瑞典的 Wennerstrom 等<sup>[4]</sup>把  $C_{60}$  置于沸腾的 $\gamma$ -环糊精( $\gamma$ -CD)水溶液中反应 48h, 首次得到能溶于水的 $\gamma$ -CD 与  $C_{60}$  的包结物,但未能从实验上证实其组成。Boulas<sup>[5]</sup>和 Priyadarsini<sup>[6]</sup>改进了 $\gamma$ -CD 与  $C_{60}$  形成包结复合物的合成方法。Boulas 通过研磨的方法得到了 $\gamma$ -CD 和  $C_{60}$  包结物,并且证明不仅中性的  $C_{60}$  而且  $C_{60}$  负离子也可以通过与 $\gamma$ -CD 包结而得到稳定的水溶性溶液。Priyadarsini 将  $5.0\times 10^{-7}\text{mol}$  固体  $C_{60}$  加入到 25mL  $\gamma$ -CD 的甲醇溶液( $5.4\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )中搅拌 1h 后,将不溶解的粉末分离出,用甲醇充分洗涤这些粉末以去除多余的纯 CD,然后将洗涤后的固体粉末溶于水,离心去除悬浮的颗粒后,即可得到  $C_{60}$  与 $\gamma$ -CD 的包结物。这种方法简单,室温下就可以进行,且  $C_{60}$  溶解度可以达到  $1.0\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。章道道等<sup>[7]</sup>采用研磨方法,反应 1h 实现了 $\gamma$ -CD 与  $C_{60}$  包结物的高效制备,通过不同物质的量的反应物配比 1:1 和 2:1 首次制得了可辨的、相对单一的固相包结物: $\gamma$ -CD/ $C_{60}$ (1:1)和 $\gamma$ -CD/ $C_{60}$ (2:1)(图 2),与 Wennerstrom 等通过简单分子模拟计算而提出的两种可能包结结构相吻合。由于 $\beta$ -CD 价格非常便宜,且原料易得,应用广泛,目前已有大量关于其毒性和药理学研究的报告,因此它与  $C_{60}$  分子形成包结复合物的研究已引起了人们的兴趣。刘勇等<sup>[8]</sup>采用环氧氯丙烷交联的水溶性 $\beta$ -环糊精聚合物( $\beta$ -CDP)作为主体,首次实现了 $\beta$ -CDP 对  $C_{60}$  的包结,这种 $\beta$ -CDP 原料易得,合成极其简便,价格便宜,水溶性也很好,因此在改善  $C_{60}$  的水溶性、探索  $C_{60}$  水相反应的可能性方面具有广阔的应用前景。Murthy 等<sup>[9]</sup>在 DMF 与甲苯混合溶剂中进行 $\beta$ -CD 与  $C_{60}$  的均相反应,两个星期后即可得到水溶性的 $\beta$ -CD 与  $C_{60}$  的包结复合物,其溶解度可达到  $4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这种包结物毒性小, $\beta$ -CD 可通过人体的消耗除去,同时 $\beta$ -CD 空穴中的  $C_{60}$  保持了它的消除生物体系中自由基的能力。另外,Shashadhar 等<sup>[10]</sup>第一次合成出了水溶性聚富勒烯。他们首先将环糊精 $\beta$ -CD 与二(*p*-氨基苯)醚(BPE)包结形成 CD-BPE 包结物(N-N 距离 968pm),然后室温下在  $C_{60}$  的二氯甲烷溶液中通过  $C_{60}$  与 CD 空穴中二(*p*-氨基苯)醚的氨基进行加聚反应,即可得到水溶性的聚  $C_{60}$ ,如图 3 所示。这种水溶性的聚  $C_{60}$  在水中的溶解度非常高,可以达到  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。他们还发现不仅是  $C_{60}$ ,富勒烯家族的其它成员及一些富勒烯衍生物也可以通过这种方法合成出水溶性的聚富勒烯。他们还对此种新型的聚合物在生物及药用领域的应用进行了初步研究,结果发现这种聚富勒烯具有比  $C_{60}$  单体还要强大的消除生物体系中自由基的能力。在有光条件下,这种聚合物还可以用来切割 DNA 低聚核苷酸,这已经通过 GPC 及膜渗透研究得到了证实。

杯芳烃是由酚单体通过亚甲基在酚羟基邻位连接而成的大环化合物,其疏水空腔大小可调,构象可变,选择性良好,能和离子及中性分子形成主客体包结物。1992 年 Williams 和 Verhoeven 首先报道了杯[8]芳烃的磺酸衍生物能与  $C_{60}$  形成水溶性电荷转移配合物( $C_{60}$  与主体的 $\pi$ 电子之间发生了电荷转移)。随后 Atwood 等<sup>[11]</sup>报道了对叔丁基-杯[8]芳烃和杯[6]芳烃可识别  $C_{60}$  分别形成了 1:1 和 1:2 的包结物。

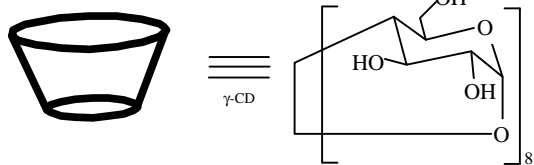


图 1  $\gamma$ -CD  
Fig.1  $\gamma$ -CD

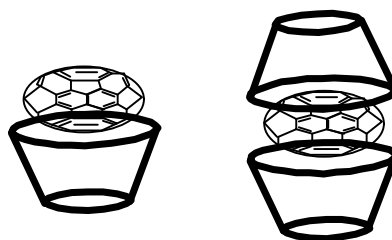


图 2  $\gamma$ -CD/ $C_{60}$ (1:1)和 $\gamma$ -CD/ $C_{60}$ (2:1)<sup>[7]</sup>  
Fig.2  $\gamma$ -CD/ $C_{60}$ (1:1) and  $\gamma$ -CD/ $C_{60}$ (2:1)

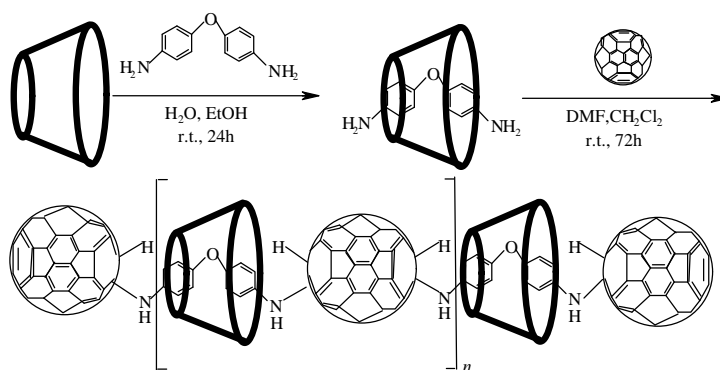


图 3 聚富勒烯的合成<sup>[10]</sup>

Fig.3 Reaction scheme for the synthesis of polyfullerene

## 1.2 其它水溶性 $C_{60}$ 复合物的制备

$C_{60}$  可与胶束、脂质体等形成水溶性复合物。Hungerbuhler 等<sup>[12]</sup>研究发现在水中  $C_{60}$  可插入泡状和胶束状膜中形成水溶性复合物。如  $C_{60}$  插入 Triton X-100 胶束体系中形成的水溶液呈棕色, 通过紫外可见光谱研究,  $C_{60}$  并不是孤立地存在于胶束内部的疏水空腔中, 而是通过  $C_{60}$  的  $\pi$  电子与 Triton X-100 的极性聚乙二醇单元相结合而存在的。黄文栋等<sup>[13]</sup>采用逆向蒸发技术成功制得水溶性  $C_{60}$ -脂质体, 将此脂质体与体外培养的人子宫颈癌细胞融合后, 用卤素灯光照后, 发现  $C_{60}$  对癌细胞具有很强的杀伤效应, 当光照达 4000lx 时, 癌细胞死亡近 100%。

$C_{60}$  还可以与某些水溶性聚合物形成水溶性复合物。如 Yamakoshi 等<sup>[14]</sup>发现  $C_{60}$  和  $C_{70}$  与聚乙烯吡咯烷酮(PVP)混合后都可以溶于水中, 溶解度分别达到  $5.6 \times 10^{-4}$  和  $2.4 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (400 和  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。其中  $C_{60}$  的溶解度比  $C_{60}$  与  $\gamma$ -环糊精或脂质体形成的包结复合物的溶解度都大。他们实验的具体方法是: 将  $C_{60}$  的甲苯溶液加入到 PVP 的  $\text{CHCl}_3$  溶液中充分混合后在真空状态下使溶剂完全挥发掉, 剩余物重新溶解在水中, 经超声波振荡后即是透明的溶液。

## 2 $C_{60}$ 水溶性衍生物的合成

$C_{60}$  通过加成反应, 在其分子上引入氨基、羟基或极性侧链等, 可改善其在水中的溶解度。

### 2.1 多羟基 $C_{60}$ 衍生物——富勒醇 $C_{60}(\text{OH})_n$ 的合成

目前国内外合成水溶性  $C_{60}$  衍生物的主要手段是通过各种化学反应得到能溶于水的多羟基  $C_{60}$  衍生物-富勒醇  $C_{60}(\text{OH})_n$ 。富勒醇  $C_{60}(\text{OH})_n$  具有烯丙位羟基和中等电子亲和力, 从而易于在

生物体系中充当自由基清除剂和水溶性抗氧化剂。

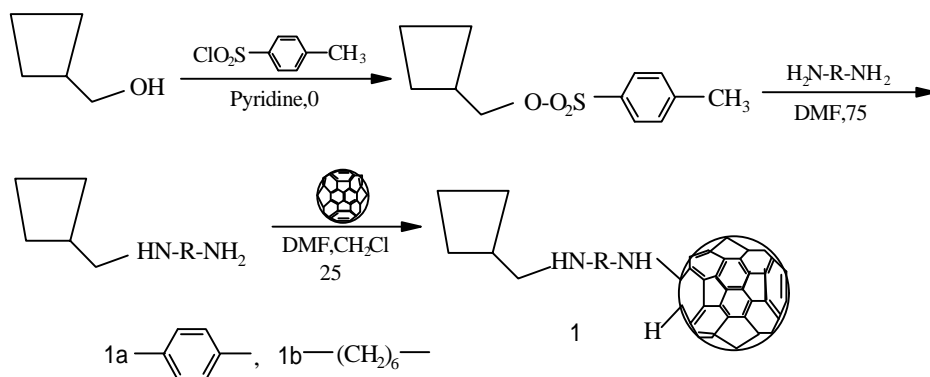
1992 年, Abdal 等<sup>[15]</sup>报道了在真空条件下, 加热混有过量 KOH 固体的  $C_{60}/C_{70}$  甲苯溶液, 生成了  $C_{60}(OH)_n$  沉淀物, 这是首次  $C_{60}$  羟基加成的报道。Schneider 等<sup>[16]</sup>采用将  $C_{60}$  硼氢化的方法, 得到了富勒醇。他们首先将过量的  $BH_3 \cdot THF$  复合物加到  $C_{60}$  的甲苯溶液中, 溶液颜色迅速由洋红色变为棕色, 这是由于形成了  $C_{60}(HBH_2)_n$  固体沉淀, 然后将  $C_{60}(HBH_2)_n$  加入到  $NaOH/H_2O_2$  混合溶液中充分水解后就可以得到富勒醇。另外他们将  $C_{60}(HBH_2)_n$  加入到冰醋酸中充分水解后也得到富勒醇。Chiang 等<sup>[17]</sup>采用芳酸  $RCOOH$  作介质, 使亲电子物质  $NO_2BF_4$  与  $C_{60}$  反应得到  $C_{60}(-OCOR)_x(OH)_y$ , 然后水解即可得到  $C_{60}(OH)_{x+y}$ 。Li 等<sup>[18]</sup>采用高效相转移催化剂四丁基氢氧化铵(TBAH)催化  $C_{60}$  甲苯溶液与浓 NaOH 水溶液之间的相转移反应, 直接将甲苯溶液中的  $C_{60}$  转化为  $C_{60}(OH)_n$  的水溶液。李添宝等<sup>[19]</sup>在用 TBAH 催化  $C_{60}$  甲苯溶液与浓 NaOH 水溶液之间的相转移反应时, 加入  $H_2O_2$  作氧化剂, 得到了一种目前反应速度最快, 条件最温和, 产率高的合成  $C_{60}(OH)_n$  的新方法。陈滇宝等<sup>[20]</sup>发明了一种制备富勒醇的新方法: 固相研磨富勒烯卤化物与强碱进行反应, 然后用甲醇从其中性水溶液中分离出富勒醇。该方法简单、高效、收率高、无副产物, 富勒醇结构组成和性能稳定, 其水溶液可长期稳定保存 5 年以上, 它可被广泛用于生物、医药、高分子材料合成、有机功能材料合成等领域。

## 2.2 氨基酸 $C_{60}$ 衍生物的合成

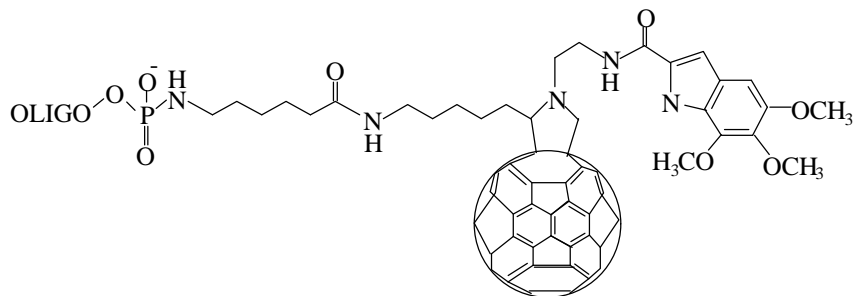
$C_{60}$  可与  $\alpha$ -氨基酸、多肽及糖等多种生物分子反应。由于这种氨基酸或多肽  $C_{60}$  衍生物具有特殊的生物活性, 能够在抑制 HIV-1 蛋白酶和光动力学治疗等方面采用, 因此引起了人们的兴趣。Zhou 等<sup>[21]</sup>通过甘氨酸钠与  $C_{60}$  反应生成了水溶性的  $C_{60}$  甘氨酸钠衍生物。Gan 等<sup>[22]</sup>通过  $\beta$ -丙氨酸钠与  $C_{60}$  反应生成了水溶性多加成衍生物  $C_{60}(NHCH_2CH_2CO_2Na)_x(H)_x$ 。经元素分析表明  $x=9$ 。 $^1H$  和  $^{13}C$  NMR 光谱证实丙氨酸钠是通过其氨基与  $C_{60}$  进行加成的。Gan 等<sup>[23]</sup>还通过  $C_{60}$  与 2-氨基乙基硫酸氢钠反应得到一种水溶性富勒烯衍生物  $C_{60}(NHCH_2CH_2OSO_3Na)_x(H)_x$ 。Bianco 等<sup>[24]</sup>合成了  $C_{60}$  多肽衍生物。Toniolo 等合成出一种水溶性  $C_{60}$  多肽衍生物, 对它的生物研究显示, 这种  $C_{60}$  多肽衍生物可能在人类单核白血球趋药性和抑制 HIV-1 蛋白酶两方面具有潜在的应用。董国孝等<sup>[25]</sup>研究了  $C_{60}$  与生物活性物质 8-叠氮基腺苷的反应, 合成了水溶性  $C_{60}$  衍生物  $C_{60}H_{12}N_6O_4$ , 并用质谱、紫外可见光谱、 $^{13}C$  NMR、 $^1H$  NMR 和 IR 对产物结构进行了表征。光谱数据表明, 加成反应发生在  $C_{60}$  表面相邻两个六元环的双键上, 形成开环轮烯结构, 产物有非常好的水溶性, 又具有生物活性取代基。

## 2.3 其它水溶性 $C_{60}$ 衍生物的合成

环糊精(CD)不仅可以与  $C_{60}$  形成水溶性包结复合物, 而且还可以与  $C_{60}$  共价结合生成具有高水溶性和生物相容性的  $C_{60}$  衍生物。ShaShadhar 等<sup>[26]</sup>用一氨基 CD 与  $C_{60}$  反应生成 CD-氨基-富勒烯化合物, 如图 4 所示。他们还用一种稳定的自由基 1,1-二苯基-2-苦基偕胺肟(DPPH)与 1a 反应, 结果表明 1a 是一种有效的自由基捕捉剂。另外, 他们还将 DNA 低聚核酸加入到 1a 的水溶液中, 通过混合溶液的紫外可见光谱可以看出 1a 与 DNA 发生了反应, 1a 逐渐被消耗掉, 说明 1a 具有切割 DNA 核酸的能力。

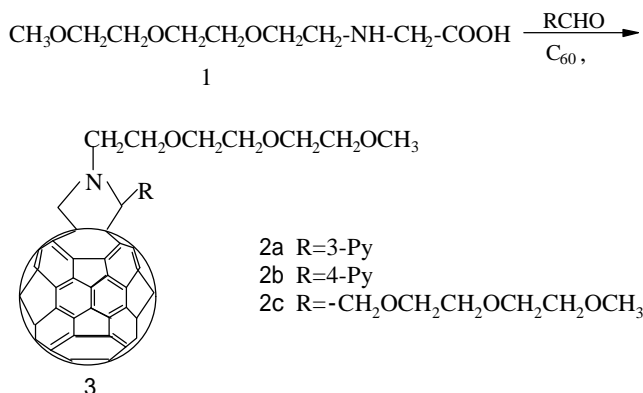
图 4 C<sub>60</sub>-环糊精共价结合化合物的形成<sup>[26]</sup>Fig.4 Synthesis of fullerene-cyclodextrin conjugates<sup>[26]</sup>

在光动力学治疗过程中, 主要问题是如何使光活性物质准确到达它的目标。近来核酸、蛋白质等有一定生物亲和性的分子与富勒烯反应所形成的化合物引起了人们特殊的兴趣。C<sub>60</sub> 与一些核酸所形成的衍生物有利于生物活性分子与细胞亲油膜的结合, 增加它们的细胞毒性和对目标的专一性, 能够使人更好理解其反应的机理。Massimo 等<sup>[27]</sup>合成出了一种富勒烯-三甲氧基吲哚(TMI)-低聚核苷酸的结合物(图 5), 这种结合物能够准确到达目标 DNA 分子, 提高光切割的有效性和序列选择性。其中 TMI 单元是一种天然抗菌素, 具有抗癌性, 而低聚核苷酸链可诱导引发高的序列选择性, 同时又可提高水溶性。

图 5 C<sub>60</sub>-三甲氧基吲哚-低聚核苷酸结合物<sup>[27]</sup>Fig.5 C<sub>60</sub>-trimethoxyindole-oligonucleotide conjugate<sup>[27]</sup>

Tatiana 等<sup>[28]</sup>用 *N*-[2-(单甲醚二甘醚基)乙基]-甘氨酸与 C<sub>60</sub> 通过 1, 3-偶极环加成反应生成了 C<sub>60</sub> 吡咯烷衍生物 2a~c(图 6)。在对其进行生物活性的测试中, 发现 2c 能够抵抗许多种微生物。在琼脂扩散测试中, 许多种细菌和霉菌被杀死。

Bingel 反应是在碱存在下 C<sub>60</sub> 与溴丙二酸酯类化合物的反应。利用这一反应可以单一地得到 6-6 闭环产物, 具有较好的收率。这一反应是富勒烯环丙烷化的有效途径, 已被广泛利用。Wilson 等<sup>[29]</sup>通过单-、三-和六-Bingel-Hirsch 加成反应合成出了一系列水溶性的氨基亚甲基富勒烯衍生物。其中三加成产物和六加成产物在水中的溶解度很高, 分别达到 152 g · L<sup>-1</sup> 和 418 g · L<sup>-1</sup>。Hirsch 等<sup>[30]</sup>利用同样的方法合成出了一种高水溶性的树枝状富勒烯单加成衍生物。这种衍生物含有 18 个羧基, 在水中的溶解度高达 254 g · L<sup>-1</sup>。

图 6 C<sub>60</sub>吡咯烷衍生物的合成<sup>[28]</sup>Fig.6 Synthesis of C<sub>60</sub>-fused functionalized pyrrolidines<sup>[28]</sup>

### 3 结束语

C<sub>60</sub>生物活性的研究表明, C<sub>60</sub>水溶性衍生物在抗艾滋病病毒、酶活性抑制、切割 DNA、光动力学治疗等方面具有独特疗效。因此水溶性 C<sub>60</sub>衍生物的不断合成, 对其生物化学活性的不断开发, 以及在生物化学、生物医学、药理学等多学科领域的广泛应用, 具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] Friedman S H, Decamp D L, Sijbesma R P et al. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115(15): 6506~6509.
- [2] Sijbesma R, Srdano G, Wudl F et al. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115(15): 6510~6512.
- [3] Tokuyama H, Yamago S, Nakamura E et al. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115(17): 7918~7919.
- [4] Anderson T, Nilsson K, Wennerstrom O et al. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1992, 8: 604~606.
- [5] Boulas P, Kutner W, Jones M T et al. J. Phys. Chem., 1994, 98(4): 1282~1287.
- [6] Priyadarsini K I, Mohan H, Tyagi A K et al. J. Phys. Chem., 1994, 98(17): 4756~4759.
- [7] 章道道, 梁强, 陈吉伟等. 科学通报, 1994, 39(4): 383~384.
- [8] 刘勇, 王丽芬, 章道道. 科学通报, 1995, 40(9): 863.
- [9] Murthy C N, Geckeler K E. Chem. Commun., 2001, 13: 1194~1195.
- [10] Shashadhar S, Bum Jin C, Kurt E G. Chem. Commun., 2000, 15: 1373~1374.
- [11] Atwood J L, Koutsantonis G A, Raston C L. Nature, 1994, 368(6468): 229~231.
- [12] Hungerbuhler H, Guldi D M, Asmus K D. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115(8): 3386~3387.
- [13] 黄文栋, 钱凯光, 张欣欣等. 1994年秋季中国材料研讨会论文集. 北京: 化学工业出版社, 1995: 497.
- [14] Yamakoshi Y N, Yagami T, Fukuhara K et al. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1994, 4: 517~518.
- [15] Abdal N, Philip B S. Tetrahedron Lett., 1992, 33(47): 7097~7100.
- [16] Schneider N S, Darwish A D, Kroto H W et al. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1994, 4: 463~464.
- [17] Chiang L Y, Upasani R B, Swirczewski J W et al. J. Am. Chem. Soc., 1992, 114(26): 10154~10157.
- [18] Li J, Takeuchi A, Oxawa M et al. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1993, 23: 1784~1785.
- [19] 李添宝, 黄克雄, 李新海等. 高等学校化学学报, 1998, 19(6): 858~860.
- [20] 陈滇宝等. CN: 1316411A, 2001.
- [21] Zhou D J, Gan L B, Xu L B et al. Fullerene Sci. Technol., 1995, 3(2): 127~131.
- [22] Gan L B, Luo C P, Xu L B et al. Chin. Chem. Lett., 1994, 5(4): 275~278.
- [23] Gan L B, Zhou D J, Luo C P et al. Chin. Chem. Lett., 1995, 6(3): 199~200.
- [24] Prato M, Bianco A, Maggini M. J. Org. Chem., 1993, 58(21): 5578~5580.
- [25] 董国孝, 李纪生, 李文革等. 科学通报, 1996, 41(3): 226~228.
- [26] Shashadhar S, Kurt E G. Chem. Commun., 2000, 13: 1101~1102.
- [27] Massimo B, Tatiana D R, Giampiero S et al. Chem. Commun., 2001, 1: 17~18.
- [28] Tatiana D R, Maurizio P. J. Org. Chem., 1996, 61(25): 9070~9071.
- [29] Christine F R, David I S, Stephen R W. Org. Lett., 2000, 2(8): 1011~1014.
- [30] Brettreich M, Hirsch A. Tetrahedron Lett., 1998, 39(18): 2731~2734.