

亜鉛ビス(1,4-ジデシルベンゾ)-ビス(2,3-ピリド)ポルフィラジンの光増感作用

坂本 恵一 (応用分子化学科)

奥村 映子 (化技教研)

1. 緒 言

フタロシアニン化合物は古くからの染料・顔料などの着色剤はもとより、近年では分子デバイス、オプトエレクトロニクス、フォトニクス、表示材料など様々な方面に適応できる重要な機能性色素として利用されるようになった。最近、機能性色素としてのフタロシアニン化合物は医療分野においても注目されるようになってきている。医療分野において、フタロシアニン化合物はガン光線力学療法(PDT; photodynamic therapy of cancer)用の光増感剤としての利用が検討されている¹⁻³⁾。

一般に、PDT は皮膚浸透性が高い 600 から 850 nm の近赤外領域のレーザー光を光増感剤の存在下で体外から照射し、発生する一重項酸素にてガン細胞を攻撃する治療法として知られている⁴⁾。

フタロシアニン化合物はポルフィリン類縁体であるが、 $\pi-\pi^*$ 遷移による Q 帯に基づく 600 から 850 nm の近赤外領域に強い吸収極大を有している。また、フタロシアニン化合物はポルフィリン化合物と異なり毒性が無く、容易に代謝されるという利点を有している^{5,6)}。このことから、フタロシアニン化合物は次世代の PDT 用光増感剤として、その応用が脚光を集めはじめている^{1,6)}。

筆者らが報告したベンゼン環をピリジン環に換えた長鎖アルキル基を有するフタロシアニン類縁体⁹⁾は、ピリジン環の窒素原子を四級化することにより水溶性になることから、アルキル基による脂溶性⁷⁾と水溶性の両親媒性⁸⁾となり、興味深い化合物である。

PDT の基礎的研究として、分子内にそれぞれ二つのノンペリフェラル位置換ジデシルベンゼン環とピ

リジン環を有する亜鉛ビス(1,4-ジデシルベンゾ)-ビス(3,4-ピリド)ポルフィラジンの三重項寿命を測定し、3,亜鉛ビス(1,4-ジデシルベンゾ)-ビス(3,4-ピリド)ポルフィラジンが PDT 用光増感剤として有用であることを報告した^{9,10)}。この化合物亜鉛ビス(1,4-ジデシルベンゾ)-ビス(3,4-ピリド)ポルフィラジンは有機溶媒に高い溶解性を持ち、脂溶性を示す。また、この化合物を四級化したものは水溶性となる。したがって亜鉛ビス(1,4-ジデシルベンゾ)-ビス(3,4-ピリド)ポルフィラジンはカチオン性の両親媒性となると考えられる。このような両親媒性フタロシアニン類縁体は次世代 PDT 用光増感剤として良好な化合物になると期待できる^{8,11)}。

Nykong ら¹¹⁾は、フタロシアニン化合物である 2,3-テトラピリドポルフィラジンとその四級化化合物である両親媒性物質が通常使用されている亜鉛フタロシアニン誘導体光増感剤と比較して優れた性質を示すことを報告している。この両親媒性物質は次世代 PDT 用増感剤として最適な物質であると考えられる。

ここでは、既報の亜鉛ビス(1,4-ジデシルベンゾ)-ビス(3,4-ピリド)ポルフィラジンと類似の化合物であり、三重項寿命が長い、亜鉛ビス(1,4-ジデシルベンゾ)-ビス(2,3-ピリド)ポルフィラジン(2,3-PP)を合成し、この化合物の四級化による両親媒化を検討した。

得られた両親媒性化合物は、その電子授受能力をサイクリックボルタメトリー(CV)によって検討した。

2. 実 験

2.1 試料

2,3-PP は 3,6-ジデシルフタロニトリル 0.12 g

(0.3mmol)、2,3-ジシアノピリジン 0.04 g (0.3 mmol)、塩化亜鉛(II) 0.05 g (0.37 mmol)および1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン(DBU) 0.07 g (0.46 mmol)を溶媒の1-ペンタノール 7 cm³中で4時間還流することにより合成した。反応後、濃青色液体を室温まで冷却し、トルエン 50 cm³を加えてろ過した後、トルエンを留去した。粗生成物はトルエンを展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(TLC; Merk 60 F₂₅₄)によって精製し、单一の濃青色固体として得た。収率 80%

2,3-PP はプロトン核磁気共鳴(¹H-NMR)スペクトル、赤外線(IR)吸収スペクトル、紫外可視吸収(UV-vis)スペクトルおよび元素分析によって確認した。

2.2 両親媒化反応

四級化剤はジメチル硫酸(DMS)、ジエチル硫酸(DES)およびモノクロロ酢酸(MCAA)を用いた。

窒素原子の四級化反応は 0.15 mmol (0.17 g) の 2,3-PP を 5 cm³ の乾燥 *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)中にて、四級化剤がそれぞれ DMS の場合 1.5 mmol (0.2 g)、DES の場合 0.6 mmol (0.1 g)、MCAA の場合 6 mmol (0.57 g) を加え、140°C にて 120 分間還流することによった。

反応終了後、生成物はアセトン 20 cm³を加えて室温まで冷却し、ろ過後、溶媒を留去した。粗生成物はテトラヒドロフラン-トルエン 8:2 混合溶液を展開溶媒として TLC によって精製した。主生成物は TLC プレートから削り取り、ピリジンによって抽出した。

2.3 測定

¹H-NMR スペクトルは 15 mg cm⁻³ 重水素化ジメチルスルホキシド溶液にて Bruker AM-400 型核磁気共鳴装置を用いて測定した。IR スペクトルは島津 FTIR-8100A 型フーリエ変換赤外分光光度計を用い、臭化カリウム錠剤法により測定した。UV-vis スペクトルは島津 UV-2400PC 型紫外可視分光光度計を用いて測定した。測定用媒はピリジン、トルエンおよび水を

使用した。蛍光スペクトルの測定は日立 F-4500 型分光蛍光光度計を使用した。測定溶媒はピリジンおよび水を用いた。元素分析は Perkin-Elmer 2400CHN 型元素分析装置を用いて測定した。CV は BAS CV-50W 型ボルタノメトリー/アナライザーを使用した。電極は作用電極および対電極として白金電極を、参照電極として銀/塩化銀電極を使用した。支持電解質はテトラブチルアンモニウム過塩素酸塩(TBAP)を用いた。CV の測定方法は既報¹²⁻¹⁵⁾と同様に行った。なお CV の測定は、すべて試料を 7.86 × 10⁻⁴ mol dm⁻³ 0.1 M-TBAP 溶液として行った。

2.4 細胞培養

IU-002 細胞を PDT 用試験に用いた。この IU-002 細胞は、アフリカミドリザル由来のものである。IU-002 細胞はウシ胎児血清 5%を含む MEM 培地にて保持した。その IU-002 細胞を 96 穴培養プレートに入れて培養した。そこに 2,3-PP などの光増感剤を培地に 0 から 2 mg cm⁻³ の濃度範囲で入れ、37°C にて 3 時間培養した。その後、IU-002 細胞は培地を除去し、リン酸緩衝溶液で洗浄し、新たな培地を与えられた。IU-002 細胞にハロゲン光を 10 分間照射した。ハロゲン光照射前後の IU-002 細胞の観察は蛍光顕微鏡を用いて行った。

3. 結果および考察

3.1 2,3-PP の合成と両親媒化

2,3-PP は ¹H-NMR、IR および UV-vis スペクトルと元素分析により同定し、目的構造であることが確認できた(表-1)。

2,3-PP の DMS、DES および MCAA による四級化生成物はそれぞれ、2,3-PP-DMS、2,3-PP-DES および 2,3-PP-MCAA と略記する。

2,3-PP の四級化生成物はすべて、暗青色粘張性固体として得られた。四級化生成物の収率はそれぞれにおいて 17 から 28% であり、平均 23% で合成できる。

Table 1 Analytical data of zinc bis(1,4-didecylbenzo)-bis(2,3-pyrido)porphyrazine and its quaternized compounds.

Compounds	Yield / %	ν_{max} (KBr) / cm ⁻¹	Found (calcd) / %	* δ (¹ H 400 MHz) / ppm
2,3-PP	80	2960($\nu_{\text{C-H}}$), 1600, 1500, 1420 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1200, 1100, 750, ($\delta_{\text{C-H}}$)	C : 73.67(73.68) H : 8.30(8.30) N : 12.28(12.28)	0.90(m, 12H, CH ₃), 1.61-2.61(m, 64H, CH ₂), 4.18-4.36(m, 8H, α -CH ₂), 7.45(m, 4H, Arom), 8.26(m, 6H, Py)
2,3-PP-DMS	25	3070, 2980($\nu_{\text{C-H}}$), 1500, 1400 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1250, 1100, 950, 810, 660($\delta_{\text{C-H}}$)	C : 49.03(49.03) H : 3.05(3.09) N : 21.39(21.43)	0.90(m, 12H, CH ₃), 0.95-1.45(m, 56H, γ -CH ₂), 1.60-2.41(m, 8H, β -CH ₂), 4.05(s, 6H, CH ₃), 4.25-4.42(m, 4H, α -CH ₂), 7.45(m, 4H, Arom), 8.02(m, 6H, Py)
2,3-PP-DES	21	3480($\nu_{\text{O-H}}$), 3050, 2960($\nu_{\text{C-H}}$), 1600, 1460, 1400($\nu_{\text{C=C}}$), 1350, 1150($\nu_{\text{S=O}}$), 1250, 920, 770($\delta_{\text{C-H}}$), 580($\delta_{\text{C-S}}$)	C : 37.14(37.11) H : 1.77(1.78) N : 18.54(18.54)	0.86(m, 12H, CH ₃), 1.02-1.63(m, 56H, γ -CH ₂), 1.88-2.61(m, 8H, β -CH ₂), 4.26-4.50(m, 4H, α -CH ₂), 7.37(m, 4H, Arom), 8.22(m, 4H, Py)
2,3-PP-MCAA	24	3480($\nu_{\text{O-H}}$), 3050, 2970($\nu_{\text{C-H}}$), 1740($\nu_{\text{C=O}}$), 1600, 1500, 1400($\nu_{\text{C=C}}$), 1210, 1100, 940, 790, 690($\delta_{\text{C-H}}$)	C : 45.02(45.05) H : 2.53(2.52) N : 17.48(17.50)	0.87(m, 12H, CH ₃), 1.13-1.70(m, 56H, γ -CH ₂), 1.82-2.61(m, 8H, β -CH ₂), 4.11-4.38(m, 4H, α -CH ₂), 6.20(s, 2H, CH ₂), 7.14-7.27(m, 4H, Arom), 8.73-16(m, 6H, Py)

^{*}Dimethyl lsulfoxide-d₆

四級化生成物は¹H-NMR、IRスペクトルおよび元素分析により同定した。

2,3-PP-DMSは元素分析値、¹H-NMRおよびIRスペクトルから、目的構造であることが確認できた。

2,3-PP-DESとDESとの反応生成物である2,3-PP-DESは、¹H-NMRスペクトルにおいてN-エチル基が見られず、IRスペクトルにおいてS=O伸縮振動が観察されたことから、四級化によるN-エチル化が生じていないと考えられる。このDESは銅ジベンゾ2,3-ジピリドポルフィラジンとの反応と同様に¹⁶⁾、芳香族求核置換によって進行するスルホン化と考えられる。したがって2,3-PP-DESは¹H-NMRスペクトルにおけるピリジンプロトンの水素数比から2,3-PPにおけるピリジン環のいずれかの位置にスルホ基を有した構造と考えられる。

2,3-PP-MCAAは元素分析値、¹H-NMRおよびIRスペクトルから、目的構造であることが確認できた。

3,4-PP-DMS、3,4-PP-DESおよび3,4-PP-MCAAの構造は元素分析値、¹H-NMRスペクトルにおける吸収の帰属とプロトン数比およびIRスペクトルにおける吸収から、ここに示した構造であると考えられる(図-1)。当然、3,4-PPと同様に3,4-PP-DMS、3,4-PP-DESおよび3,4-PP-MCAAは、それらの分子中に存在するピリジン環の位置と配向方向の異なる5つの位置異性体の混合物である。

2,3-PPはデシル基を有するため、トルエン、クロロホルム、ピリジン、メタノールなどの有機溶媒に可溶であるが、水には不溶であった。

2,3-PP-DMS、2,3-PP-DESおよび2,3-PP-MCAAはトルエン、クロロホルム、ピリジン、メタノールなどの有機溶媒ばかりではなく、水にも溶解することが確かめられ、両親媒性を示すことが裏付けられた。なお、溶解性は各々の試料5mgをそれぞれの溶媒0.5cm³へ加え、完全に溶解したか否かで判定した。

3.2 両親媒化生成物の分光特性と酸化還元特性

UV-visスペクトルにおいて、両親媒化生成物はすべて、ポルフィラジン環のHOMO-LUMO間に相当するπ-π*遷移によるQ帯に基づく700nm付近に吸収極大が観察され、3,4-PPおよび2,3-PPにおけるQ帯吸収の686nmおよび663nmよりも長波長側にシフトしていた。水溶媒における両親媒化生成物のUV-visスペクトルは、有機溶媒を用いたときよりも短波長側にシフトしており、幅広となっていることが見出された。両親媒化生成物は水溶液中において、分子会合しやすいことが推測される(表-2)。

CVの形状は四級化の前後で大きく変化していることが観察された。酸化還元電位は、2,3-PPでは3つの

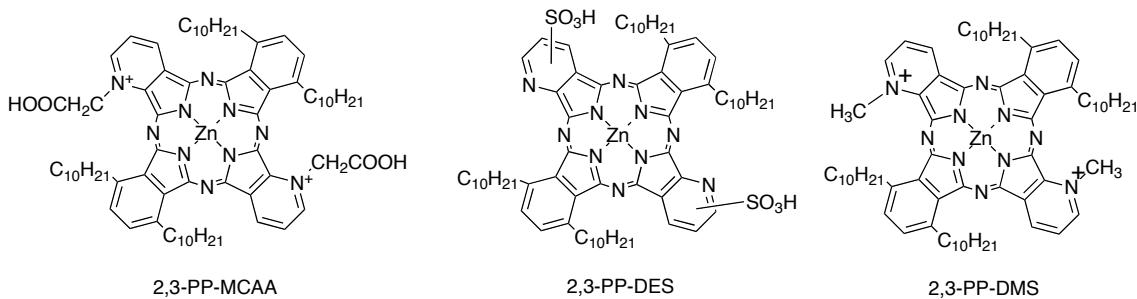


Fig.1 Molecular structures of quaternized compounds

Table 2 Uv-Vis and fluorescence spectral data of zinc bis(1,4-didecylbenzo)-bis(2,3-pyrido)porphyrazine and its quaternized compounds

Compound	Q-band		Fluorescence	
	λ_{max} pyridine / nm	λ_{max} water / nm	F_{max} pyridine / nm	F_{max} water / nm
2,3-PP	687 a665		694	
2,3-PP-MCAA	<u>679</u> , 650 <u>a677</u> , a620	<u>687</u> , 647	692	688
2,3-PP-DES	<u>693</u> , 658, 628, 597 a673, a645, a605	708, <u>687</u> , 652	698	691
2,3-PP-DMS	746, <u>673</u> , 649, 606 a738, <u>a668</u> , a641, a600	723, <u>676</u> , 646	683	688

Underline; main peak

a in toluene

アノード波と4つのカソード波の7種類の不可逆ピークとして現れていた。2,3-PPの四級化生成物の酸化還元電位は四級化剤の違いによってそれぞれ互いに異なっているが、同じ四級化剤を用いた生成物どうしはもとのフタロシアニン類縁体が異なっても、同じような酸化還元電位が現れていた。CVは2,3-PP-DMSでは2つのアノード波と4つのカソード波が、2,3-PP-DESでは4つのアノード波と2つのカソード波が、2,3-PP-MCAAでは2つのアノード波と3つのカソード波が現れた。さらに、32,3-PP-DMSおよび

2,3-PP-DESは可逆波が還元電位側で現れていた（図-2、表-3）。

フタロシアニン化合物の酸化還元は中心金属とフタロシアニン環の相互作用でおこることが知られている¹⁶。しかし亜鉛を中心金属とするフタロシアニン化合物では、酸化還元は中心金属の亜鉛が不活性であり、フタロシアニン環のみで生じている¹⁶。このことは2,3-PPでも同様であり、それらの酸化還元はフタロシアニン環によるものと考えられる。すなわち、2,3-PP

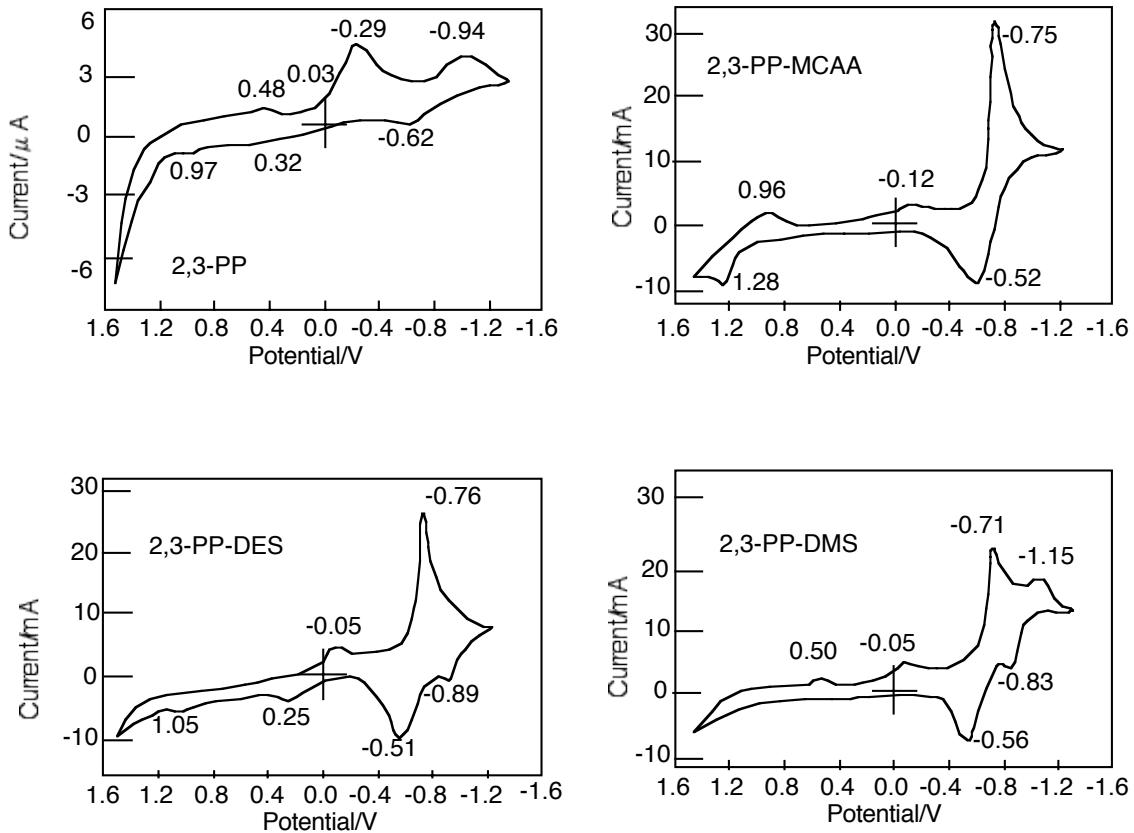


Fig. 2 Cyclic voltammograms of zinc bis(1,4-didecybenzo)-bis(2,3-pyrido)porphyrazine and its quaternized compounds

で観察された CV 形状の違いは分子中のピリジン窒素の影響と推定できる。

一般に、フタロシアニン化合物の酸化還元はポルフィラジン環の 18π 電子に起因する環電流および環電流の電気的環境に影響を及ぼす側鎖の置換基効果に依存している^{10, 17-23)}。すなわち四級化によって両親媒性となったことで、2,3-PP-DMS および 2,3-PP-DES は還元側にて電子移動が起こることを示している。また、すべての四級化生成物の酸化還元電位は四級化前の化合物に見られるピークが観察される。したがって、2,3-PP の電子授受能力は四級化によって変化しないと考えられる。

3.3 ガン細胞での評価

IU-002 細胞に注入した 2,3-PP-DMS の蛍光物質に注目を、PDT の評価に使用した。この系では細胞が破壊されていることが観察可能である。細胞が破壊されな

い場合、蛍光物質は選択的に細胞中で濃縮される。

10 分間はハロゲン光を照射した後、細胞が破壊されて蛍光の消失が観察された（図-3）。

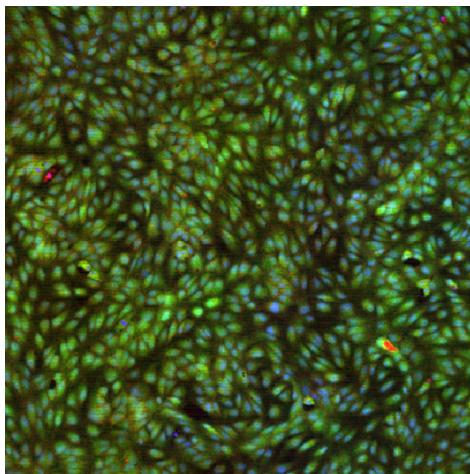
このことは、光を照射された IU-002 細胞中の 2,3-PP-DMS はその細胞の破壊を引き起こされると考えられる。またこの現象は IU-002 細胞中の 2,3-PP-DMS による蛍光の減少によって検出できる。

4. 結論

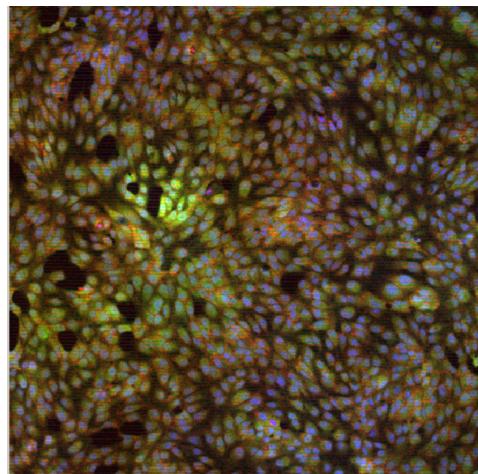
分子内にそれぞれ二つのノンペリフェラル位置換ジデシルベンゼン環とピリジン環を有する 3,4-PP および 2,3-PP は DMS、DES および MCAA を用いて四級化反応を行った。

四級化剤に DMS および MCAA を用いた場合に四級化が達成でき、DES ではスルホ基が導入された。これら生成物は両親媒性を示した。

すべての四級化生成物の酸化還元電位は四級化前



(a)



(b)

Fig. 3 Fluorescence image of IU-002 cells. (a) Control, (b) Incubated with 2,3-PP-DMS irradiated with halogen light for 10 minutes.

の化合物に見られるピークが観察された。したがって、2,3-PP の電子授受能力は四級化によって変化しないと考えられる。

IU-002 細胞中に 2,3-PP-DMS を注入して光を照射すると、その細胞は 2,3-PP-DMS によって破壊を引き起こされることがわかった。

文 献

- 1) B. Paquette, H. Ali, R. Langlis, J. E. van Lier: *Photochem. Photobiol.*, **47**, 214 (1998).
- 2) D. Wohrle, N. Iskander, G. Graschew, H. Sinn, E. A. Fridrich, W. Maier-Borst, P. Schlag: *Photochem. Photobiol.*, **51**, 351 (1990).
- 3) K. Fukushima, K. Tabata, I. Okura: *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2**, 219 (1998).
- 4) G. Jori: *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **36**, 87 (1996).
- 5) K. Tabata, K. Fukushima, K. Oda, I. Okura: *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **4**, 278 (2000).
- 6) T. J. Dougherty: *J. Photochem. Photobiol.*, **58**, 895 (1993).
- 7) M. J. Cook, I. Chambrier, S. J. Cracknell, D. A. Mayes, D. A. Russel: *Photochem. Photobiol.*, **62**, 542 (1995).
- 8) M. P. De Dilippis, D. Dei, L. Fantetti, G. Roncucci: *Tetrahedron Lett.*, **41**, 9149 (2002).
- 9) K. Sakamoto, E. Ohno-Okumura, T. Kato: *J. Jpn. Soc. Colour Mater.*, **76**, 342 (2003).
- 10) 加藤拓, 坂本恵一: 色材, **75**, 214 (2002).
- 11) I. Seotsanyana-Mokhosi, N. Kuznetsova, T. Nyokong: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **140**, 215 (2001).
- 12) K. Sakamoto, E. Ohno: *J. Soc. Dyers Colourist.*, **112**, 368 (1996).
- 13) K. Sakamoto, E. Ohno: *Prog. Org. Coat.*, **31**, 139 (1997).
- 14) 大野映子, 坂本恵一: 日化, **1995**, 730.
- 15) 大野映子, 坂本恵一: 日化, **1997**, 58.
- 16) C. C. Lezonoff, A. B. P. Lever: "Phthalocyanines Properties and Application, Vol. 3", p.23, VCH, New York (1993).
- 17) 坂本恵一, 芝宮福松: 色材, **59**, 517 (1986).
- 18) 大野(奥村) 映子, 坂本恵一: 色材, **72**, 345 (1999).
- 19) K. Sakamoto, E. Ohno: *Dye Pig.*, **35**, 375 (1997).
- 20) K. Sakamoto, E. Ohno: *Dye Pig.*, **37**, 291 (1998).
- 21) K. Sakamoto, T. Kato, T. Kawaguchi, E. Ohno-Okumura, T. Urano, T. Yamaoka, S. Suzuki, M. J. Cook: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **153**, 245 (2002).
- 22) K. Sakamoto, E. Ohno-Okumura, T. Kato, T. Kawaguchi, M. J. Cook: *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **7**, 83 (2003).
- 23) H. H. Willard, L. L. Merritt Jr., J. A. Dean, F. A. Settle Jr., "Instrumental Methods of Analysis, 7th ed.", p.197-222, Wadsworth, Belmont (1988).