

蛍光プローブの利用を目指したローダミン系色素の合成と光学特性

日大生産工(院) ○平田 康輔 日大生産工 市川隼人

1 まえがき

がんの早期発見や早期切除はがん治療の最も重要な方法である。がん細胞の検出にはマーカーと呼ばれる多く発現するタンパク質を標的とする抗体を有機蛍光色素により蛍光標識したものを用いてイメージングする方法や、アクティブイタブル蛍光プローブを用いることで病変部位を可視化する方法が検討されている。

そこで、昨年度生体適合性のあるアルギン酸と生体毒性の少ない蛍光色素であるローダミンBをエチレンジアミンをリンカーとして化学修飾させた蛍光プローブを合成した。しかし、発光強度や吸光度が低く置換度も正確に求められなかった。そこで、エチレンジアミンをリンカーとしたローダミンBについて分光光度計を用いて吸光度を調べた。

Scheme 1.

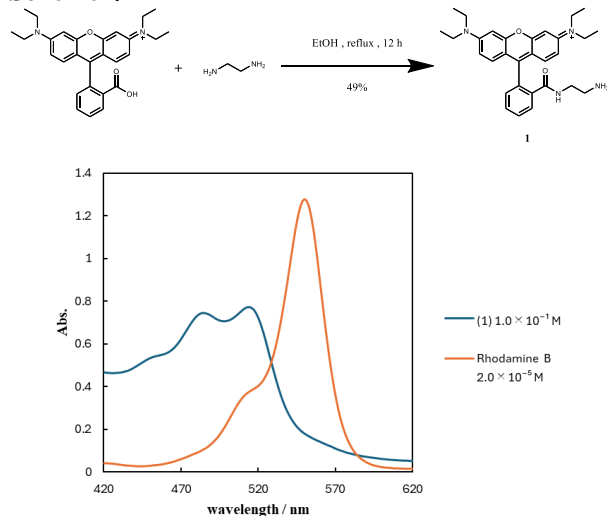


Figure 1. ローダミンBと化合物1の吸光度

ローダミンBと化合物1は同じキサンテン系骨格を持っているはずであるが全く異なる吸収波形を示した。また、化合物1はローダミンBの約1/10,000の吸光度しか示さない。この吸

収波形や吸光度の違いは化合物1の互変異生体によるものと考えられる。

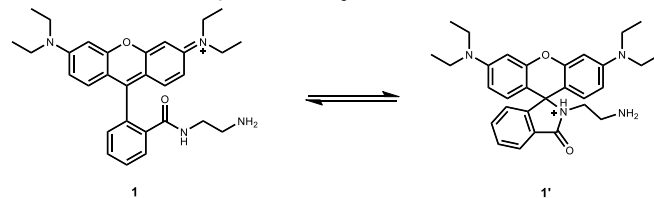


Figure 2. 化合物1の互変異生体

化合物1の互変異生体である1'は化合物1のsp²混成軌道から成る共役構造の一部が解消されsp³混成軌道となり、平面構造をとらなくなっている。このことから蛍光強度や吸収波形が影響すると考えられる。よって、本研究では安定で、吸光度の高い構造を維持した5位にカルボキシ基を持ったローダミン系色素の合成や官能基変換、光学特性の評価を行うことを目的とする。また、エチレンジアミンのみではなく、別の化合物を用いたリンカーの検討も行う。これにより、発光強度を維持した官能基変換が期待される。

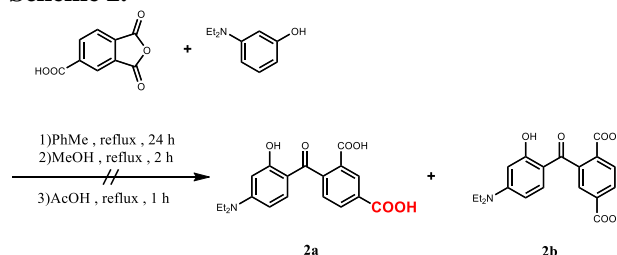
2 実験方法

2-1 5-カルボキシローダミンBの合成

2-1-1 中間体2aを経由した5-カルボキシローダミンBの合成

トリメリット酸無水物と3-ジエチルアミノフェノールを当量ずつ加えトルエン、メタノール、酢酸を溶媒として還流したり。

Scheme 2.



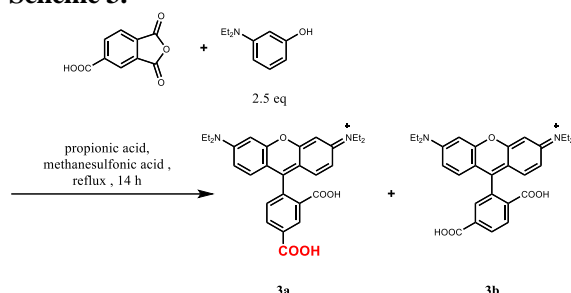
2-1-2 5-カルボキシローダミンBのワンポット合成

Synthesis and Optical Properties of Rhodamine Dyes
for Utilization as Fluorescent Probes

Kosuke HIRATA and Hayato ICHIKAWA

トリメリット酸無水物と3-ジエチルアミノフェノール(2.5当量)加えプロピオン酸溶媒中、メタンスルホン酸を酸触媒とし14時間還流した²⁾。

Scheme 3.

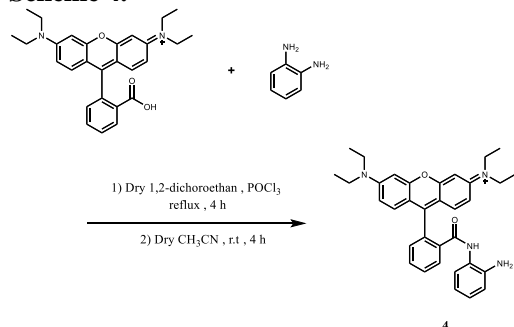


2-2 リンカーの検討

2-2-1 *o*-フェニレンジアミンをリンカーとしたロードミンBの合成

ロードミンBと塩化ホスホリルを窒素雰囲気下、1,2-ジクロロエタン中で4時間還流した。続けて*o*-フェニレンジアミンを加え窒素雰囲気下、アセトニトリル中で4時間撹拌した³⁾。

Scheme 4.



2-2-2 エチレングリコールをリンカーとしたロードミンBの合成

ロードミンBとエチレングリコールを窒素雰囲気下で合成を試みた⁴⁾。また、ロードミンBと塩化チオニルを窒素雰囲気下、1,2-ジクロロエタン中で6時間還流し、続けてジクロロメタン中、室温で12時間撹拌を行った⁵⁾。

3 実験結果および考察

3-1 5-カルボキシロードミンBの合成

3-1-1 中間体2aを経由した5-カルボキシロードミンBの合成

中間体2aは酢酸での還流後、4℃で冷却することで沈殿物が析出するはずであったが、参考にした論文ではジエチルアミノ基ではなく、ジメチルアミノ基であったため構造の違いより沈殿物が析出しなかったと考えられる。

3-1-2 5-カルボキシロードミンBのワンポット合成

ワンポット合成では3aに加えて位置異性体である4aが合成される。これらの位置異性体のTLCにおけるR_f値は非常に近くフラッシュカラムクロマトグラフィーでの分離を試みたが¹H NMRの結果3aのスペクトルに加え4aのスペクトルが確認された。今後、長いカラムを用い理論段数を高くすることで単離を再度試みる。

3-2 リンカーの検討

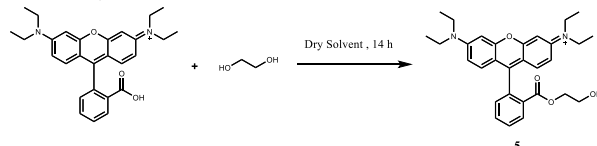
3-2-1 *o*-フェニレンジアミンをリンカーとしたロードミンBの合成

TLCより原料のスポットに加え新たにスポットが現れたため精製操作を行ったが¹H NMRの結果目的物ではなかった。カラムクロマトグラフィーによる精製操作が大変であったためスケールを小さくして行う予定である。

3-2-2 エチレングリコールをリンカーとしたロードミンBの合成

化合物の溶媒や酸触媒の有無、反応温度の検討を行った(**Table 1**)⁴⁾。しかしながら、どの条件でも目的物を得ることができなかった。そのため、塩素化を経由した方法を行った。原料のスポットに加え新たにスポットが現れたが¹H NMRの結果目的物ではなかった。今後、溶媒をDMFとし塩化ホスホリルとしたVilsmeier試薬を用いた酸塩化物を経由した方法を行う予定である。

Table 1.



entry	solvent	temperature (°C)	H ₂ SO ₄ (mL)	equivalent of ethylene glycol (eq)	yield (%)
1	Acetonitrile	reflux	1	10	0
2	Ethanol	reflux	0	10	0
3	Ethanol	reflux	1	10	0
4	Ethylene glycol	140	1	444	0

4 参考文献

- 1) Kvach, M. V.; Stepanova, I. A.; Prokhorenko, I. A.; Stupak, A. P.; Bolibrukh, D. A.; Korshun, V. A.; Shmanai, V. V. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1673–1682.
- 2) Tirla, A.; Hansen, M.E.; Rivera-Fuentes, P. *Synlett* **2017**, *29*, 1289–1292.
- 3) Hu, Y.; Chen, L.; Jung, H.; Zeng, Y.; Lee, S.; Swamy, K. M. K.; Zhou, X.; Kim, M. H.; Yoon, J. *ACS Appl.* **2016**, *8*, 22246–22252.
- 4) Scheibel, D.M.; Guo, D.; Luo, J.; Gitsov, I. *Biomacromolecules.* **2020**, *21*, 2132–2146.
- 5) Yan, C.-N.; Xu, L.; Liu, Q.-D.; Zhang, W.; Jia, R.; Liu, C.-Z.; Wang, S.-S.; Wang, L.-P.; Li, G. *Polymers.* **2019**, *11*, 1228.