

キサントレン系色素の分析化学的利用と創製に関する研究

神野 伸一郎^{*,a}, 藤田 芳一^a

Syntheses and Applications of Xanthene Dyes for Analytical Chemistry

Shinichiro KAMINO^a and Yoshikazu FUJITA^a^a Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 2, 2009; Accepted November 18, 2009)

Xanthene-based dyes such as fluorescein and rhodamine are widely used as chromogenic and/or fluorescent probes owing to their high molar-coefficient, high quantum yields, low-energy excitation and emission wavelength, and biocompatibility. Herein we have summarized the syntheses and application of xanthene dyes for analytical chemistry. Firstly, a highly spectrophotometric method for the determination of aluminum was developed. This method used the color reaction between *m*-carboxyphenylfluorone (MCPF) as a chromogenic probe and aluminum in the presence of surfactant, Poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP, K-90). The proposed method showed excellent sensitivity (molar absorptivity of $1.70 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and reproducibility (RSD = 0.35%, $n=6$). Linearity was over the range 3-140 $\mu\text{g L}^{-1}$ with a correlation coefficient of 0.999, and the effects of foreign substances were low. Then a novel spectrophotometric method was established for the determination of quinine and its related drugs based on ternary complex formation among *o*-sulfophenylfluorone, copper (II) and quinine. In the determination of quinine, Beer's law is applied for the range of 0.2~3.2 μg . The effective molar absorptivity at 590 nm and the relative standard deviation were $2.0 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and 2.0% ($n=6$), respectively. The method was successfully applied to assays of quinine and its related drugs in pharmaceutical preparations. In addition, it was suggested that the ternary complex showed thermochromism. Finally, we have demonstrated the synthesis of regioisomerically pure unsymmetrical xanthene derivatives consisting of three units can be independently modified to control their physical properties. The photochemical properties of the synthetic unsymmetrical xanthene derivatives were investigated in solution by UV-vis absorption and fluorescence measurements, and their cell imaging properties were examined by confocal laser-scanning microscopy. Further efforts are ongoing to explore probes for chemical biology. From these findings, we propose that xanthene dyes are useful for tools to develop the analytical chemistry.

Key words—Xanthene-based dyes (Xant); spectrophotometry; aluminum; quinine; regioisomerically pure unsymmetrical Xant; Rhodol; fluorescence imaging.

1. はじめに

分析化学は、分析手法や試薬の分子設計・創出等のソフト面と測定機器のハード面が、緊密に連

携し合い発展してきたが、機能性に富む色素が本来持っている種々の特性を用途に応じて抽出し、それらを有効に利用するための探索は、分析化学分野のみならず科学全般の進展においても重要

* 現所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学），e-mail: kamino@pharm.okayama-u.ac.jp

^a 大阪薬科大学臨床化学研究室

本論者は、神野伸一郎の博士論文をもとに再構成したものである。

で、研究対象として大変興味深い¹⁾

色素分子は光吸収性や光放射性など多種多様な機能を有するため、色素が本来持つ特性及び機能を理解し、適切な測定法を構築することで、標的化合物を検出する有効な光化学プローブとなる。また、標的化合物との相互作用による色素の発色性や蛍光性の変化を、吸光や蛍光シグナルに置き換え、簡易な分光光度法により計測できるため、感度や操作性の面で極めて有力な解析手段となる。

キサントレン系色素²⁾は、Fig. 1 に示すように 3H-xanthene を基本骨格とする化合物であり、その応用範囲は、分析試薬としてだけでなく、記録・表示などの情報用色素、増感剤や医療診断用色素など多岐にわたっている

キサントレン系色素の特徴としては、(1) モル吸光係数や蛍光量子収率が大きいこと、発色及び蛍光両面での反応の追跡が可能である (2) 極大吸収波長及び極大蛍光波長が長波長である (3) 耐光性に優れている、(4) 生体毒性が少ない、(5) 高い水溶性を有する、などであるが、本色素のより広範な特性・機能を見出し、新しい分析方法を考察すれば、種々の分野においてなお一層の進展が期待できる。

本研究では、キサントレン系色素の分析化学的ツールとしての更なる応用と機能性に富んだ新規キサントレン系色素の創製を目的として探査した。第2部では、キサントレン系色素の発色プローブへの利用として、フェニルフルオロン誘導体 (PFs) を発色プローブとする金属イオンのアルミニウム、並びに医薬品のキニーネの新規吸光光度定量法を開発した。また用いた PFs の構造化学的キャラクタ

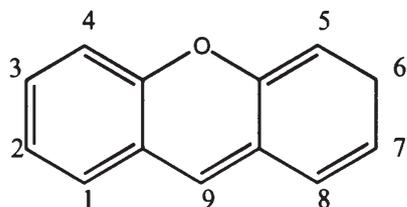


Fig. 1 Structure of 3H-xanthene.

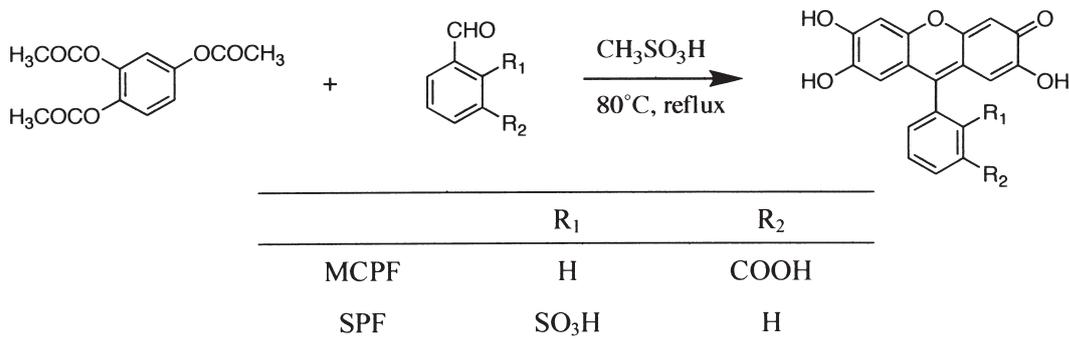
リゼーションを行った。第3部では、キサントレン系色素の蛍光プローブへの利用として、非対称型キサントレン系色素の設計と位置異性体の選択的合成を目的とした合成法を考案し、数種の新規非対称型キサントレン系色素を創製した。更に、フルオレセインとローダミンの構造的ハイブリッドである Rhodol 誘導体について、それらの光化学的特性について考察した。続いて、Rhodol 誘導体2種の蛍光イメージングプローブとしての評価について、ヒト肺線ガン細胞中で共焦点レーザー顕微鏡を用いて追跡した。

2. キサントレン系色素の発色プローブへの利用；PFs を用いる生体機能関連化合物の吸光光度定量法

2,6,7-トリヒドロキシキサントレン系色素であるフェニルフルオロン誘導体 (PFs) は、各種金属イオンと安定な呈色錯体を形成することが知られている。従って、これらと金属イオンによる二元錯体、及び被分析物質、PFs 並びに金属イオンによる三元錯体を生成させ、更にこれらを界面活性剤により形成されるミセル溶液中で反応させると、(a) 高次錯体生成に伴う高感度化と呈色体の安定化、(b) 生成する呈色錯体のミセル界面への濃縮効果による感度の上昇と安定性の増大、(c) 選択性の向上、などの効果が現れる³⁾。今回、発色プローブである PFs を合成し、これらを二元及び三元錯体生成反応系へ適用し、金属イオンとしてアルミニウム、医薬品としてキニーネの吸光光度定量法を開発について試みた。加えて、PFs の構造化学的キャラクタリゼーションを行った。

2-1. フェニルフルオロン誘導体 (PFs) の合成

PFs の合成は、scheme 1 に従い行った。1,2,4-ベンゼントリールトリアセテートとベンズアルデヒド誘導体を 20% メタノール水溶液に溶解し、メタンスルホン酸を触媒として、80℃で 48 時間加



Scheme 1 Synthesis of phenylfluorone derivatives.

熱還流した。粗化合物を無水酢酸でアセチル化し、得られたトリアセチル化体をシリカゲルクロマトにより分離し、次いで水酸化カリウムでけん化して精製した。

2-2. *m*-カルボキシフェニルフルオロン (MCPF) を用いるアルミニウムイオンの吸光光度定量法

アルミニウムは、クラーク数第3位で地殻中に非常に多く含まれる元素であり、我々の日常生活に深く浸透している。ところがアルミニウムの体内への摂取蓄積により引き起こされる疾患には、アルミニウム脳症、神経毒性や骨軟化症などが報告されている⁴⁾。一方、米国では中心静脈栄養 (TPN) に使用される注射剤中 (LVP) のアルミニウムのコントロールが検討され、Food and Drug Administration (FDA) は、輸液製剤中のアルミニウムの規制を2004年から実施している。今回の規制で要求される測定方法は、TPNに用いるLVPに含有した25 μg L⁻¹付近のアルミニウム濃度を測定できることが必要である。更に、先進国における上水道施設では、原水の処理方法としてポリ塩化アルミニウムによる凝集沈殿法が広く用いられており、施設の一部では、沈殿槽でのアルミニウムイオンの除去が不十分で、水道水にsub mg L⁻¹レベルのアルミニウムが含まれる場合がある。従って、医療

現場並びに地球環境科学の分野でアルミニウムの高感度で簡便な測定方法が熱望されている。

微量アルミニウムの計測に使用されているのは、一般には黒鉛炉原子吸光光度法 (GF-AAS) や誘導結合型プラズマ原子発光法 (ICP-OES)⁵⁾ であるが、これらは装置が高価で普及が十分でない上、総量の分析が可能であってもスペシエーションなどを正確に評価することは困難である。また近年、多数報告されている蛍光検出による高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) や、発色プローブに8-キノリノール、クロムアズロールS、2,2'-ジヒドロシニアゾベンゼン (DHAB) やメチルチモールブルーなど⁶⁾ を用いた吸光光度法は、感度 (μg L⁻¹ レベル)、簡便性や選択性といった面で多くの問題点を抱えている。しかしながら吸光光度法は、安価な機器を用いて簡易な操作で信頼しうるデータが比較的高感度に得られるなどの特徴を有しているため実用分析には広く利用されている。

PFsは、分子内電荷移動現象を示すことから、電子ドナー性置換基でかつアルミニウムと配位しやすい (O, O) 配位子が、電子アクセプターであるアルミニウムと結合する際、深色効果を示し、その色調変化を定量的に追跡できると考えられる。従って、フェニルフルオロン (PF) の *m* 位にカルボキシル基を導入したMCPFを新規に合成し、このMCPFとアルミニウム {Al(III)} との反応性を精査し、Al(III) の高感度で簡便な吸光光度定量法の

確立を目的として検討したところ、Tris-塩酸緩衝液とPVPミセル界面下、MCPFを用いるAl(III)の簡便かつ高感度な新規吸光光度定量法を開発した。

本法は高感度 ($\epsilon = 1.7 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) で、Table 1 に示すように従来のAl(III)での吸光光度法に比べて2~10倍の鋭敏度を示し、医療現場で問題となる $25 \mu\text{g L}^{-1}$ 付近の濃度にも十分対応できることを確認した。また、Al(III)量 $50 \mu\text{g L}^{-1}$ についてRSDは0.35% (n=6) と非常に再現性に優れ、クリーンルーム等を用いなくても $\mu\text{g L}^{-1}$ のレベルの安定したアルミニウム測定が可能であった。なお、本法を製剤、生体及び水道水中のAl(III)の分

析に応用したところ、製剤及びヒト尿には、前処理無しで、牛血清及び水道水には、マスク剤としてKCNを添加したのみで、分析値、添加回収率とも良好な値を示し、本定量法が実用分析法として十分利用できることを認めた。(Table 2) また、本反応で生成する呈色体のモル比は、PVP共存下でのAl(III):MCPF = 1:2であり、PVP非共存下ではAl(III):MCPF = 1:1 ($\epsilon = 6.5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) であることから、本法の定量感度の上昇は、PVPミセル界面下における反応化学種の濃縮効果に付随する錯体の高次化現象に起因するものと推察された。

Table 1 Comparison of sensitivities based several methods for aluminum.

Methods of determination for aluminum	apparent molar absorptivity ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
this method	1.7×10^5
8-hydroxyquinoline method	7.3×10^3
chrome Azurol S method	1.1×10^5
DHAB method	3.7×10^4
methylthymol blue method	1.9×10^4
extractive xylene method	1.7×10^5

Table 2 Assay of aluminum(III) preparation and recovery tests in pharmaceutical and biological sample.

Sample	Amounts of Al(III), mg		Recovery ¹⁾ (%)	RSD ²⁾ (%)
	Nominal	Proposed		
Aspirin Aluminum (Tablet)	45.0	44.4	98.7	2.1
Human urine ⁴⁾	— ³⁾	— ³⁾	104.6	2.3
Bovine serum ⁵⁾	— ³⁾	— ³⁾	101.9	1.9
Tap water ⁵⁾	— ³⁾	— ³⁾	97.2	1.6

1) for $50 \mu\text{g L}^{-1}$ Al(III). 2) RSD: Relative standard deviation (n=6). 3) undetermined.

4) no pretreatment. 5) KCN ($2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) was added as a masking agent.

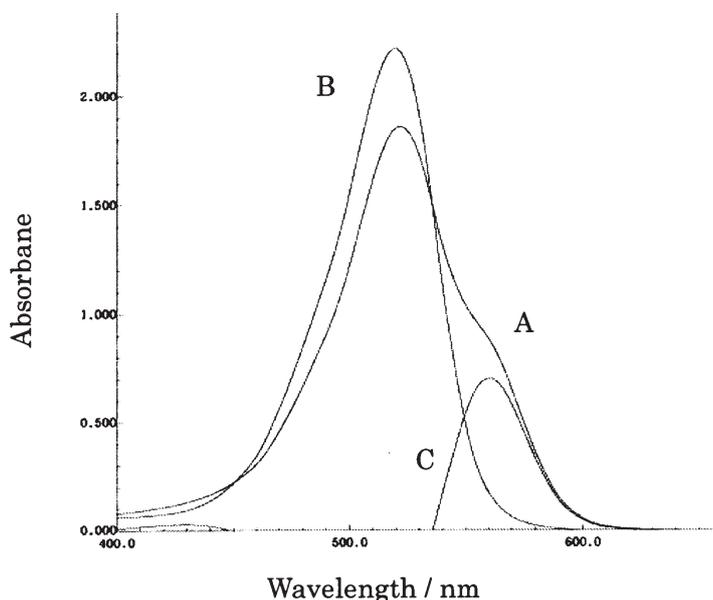
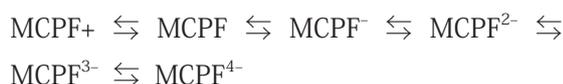


Fig. 2 Absorption of spectra.

2-3. MCPF の酸解離指数の算出と構造式の推定

MCPF は 0~10 の pH 範囲においては、次のように解離すると推察される。



従って、 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ MCPF の吸収スペクトルを Fig. 3 に示すように pH 0~10 まで測定し、酸解離指数 (pK_a) を以下の方法で算出した。緩衝液として、 0.2 mol L^{-1} リン酸塩緩衝液を使用した。

pK_{a1} の算出:

MCPF の pK_{a1} は、以下の平衡式を用い、吸光度法により算出した。即ち、



平衡定数 K_1 は、

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{MCPF}]}{[\text{MCPF}^+]} \quad \dots \dots (1)$$

と表され、Henderson-Hasselbalch 式より

$$\text{pH} = \text{pK}_{a1} - \log \frac{[\text{MCPF}^+]}{[\text{MCPF}]} \quad \dots \dots (2)$$

pH 0~3.5 までの吸収スペクトルを測定した後、得られたスペクトルを精査し、 MCPF^+ が単独で存在する pH を 0.16 と仮定し、その 460 nm での吸光度を A_{MCPF^+} とした。同様に、MCPF が単独で存在する pH を 3.16 と仮定し、その 460 nm での吸光度を A_{MCPF} とした。pH 0.16~3.16 の間の 460 nm でのそれぞれの吸光度を A とした時、(2) 式は、

$$\text{pH} = \text{pK}_{a1} - \log \frac{[A - A_{\text{MCPF}}]}{[A_{\text{MCPF}^+} - A]} \quad \dots \dots (3)$$

となる。この pH 領域における 460 nm での吸光度を詳細に測定し、(3) 式と作図法を用いて pK_{a1} を算出したところ、 $\text{pK}_{a1} = 2.60$ が得られた。

pK_{a2} と pK_{a3} の算出:

MCPF の pK_{a2} と pK_{a3} は、以下より算出した。即ち、MCPF が 0~10 の pH 範囲において次のよ

うに解離し,



さらに溶液の吸収スペクトルに MCPF と MCPF⁻ の等吸収点 λ_{i1} , MCPF⁻ と MCPF²⁻ の等吸収点 λ_{i2} が存在するとき, それぞれの波長を λ_{i1} , λ_{i2} とし, モル吸光係数を ϵ_{i1} , ϵ_{i2} とする.

今回, MCPF の pH0~10 までの範囲で吸収スペクトルを測定したところ, 等吸収点 $\lambda_{i1} = 476 \text{ nm}$ 及び $\lambda_{i2} = 485 \text{ nm}$ が得られた.

等吸収点 $\lambda_{i2} = 485 \text{ nm}$ における MCPF 溶液の吸光度 A は,

$$A = \epsilon_a[\text{MCPF}] + \epsilon_b[\text{MCPF}^-] + \epsilon_c[\text{MCPF}^{2-}] \\ = \epsilon_a[\text{MCPF}] + E_b\{[\text{MCPF}^-] + [\text{MCPF}^{2-}]\}$$

MCPF の総濃度を C_{total} とすると,

$$C_{\text{total}} = [\text{MCPF}] + [\text{MCPF}^-] + [\text{MCPF}^{2-}]$$

pH = $\text{p}K_{a2}$ の時, Henderson-Hasselbalch 式より,

$[\text{MCPF}] = [\text{MCPF}^-]$ となるが, この pH では, $[\text{MCPF}^{2-}]$ は無視できる.

$$A = \epsilon_a[\text{MCPF}] + E_b\{[\text{MCPF}^-] + [\text{MCPF}^{2-}]\}$$

$$= \epsilon_a[\text{MCPF}] + E_b[\text{MCPF}^-]$$

$$= \epsilon_a C_{\text{total}}/2 + E_b C_{\text{total}}/2$$

$$A = (\epsilon_a + E_b)C_{\text{total}}/2$$

従って, $\lambda_{i2} = 485 \text{ nm}$ における各 pH の実測値とそれぞれの吸光度を求め, A を示す pH が $\text{p}K_{a2}$ となる. 以上の考察に従い, $\text{p}K_{a2}$ の解析を行ったところ, $\text{p}K_{a2} = 3.85$ と算出された.

上と同様に λ_{i1} における吸光度を解析して求めた結果, $\text{p}K_{a3} = 6.10$ と算出された.

$\text{p}K_{a4}$ 及び $\text{p}K_{a5}$ は, $\text{p}K_{a3}$ と非常に接近しているので今回は算出することができなかったが, MCPF は少なくとも 4 種以上のイオン種が存在することが分かった.

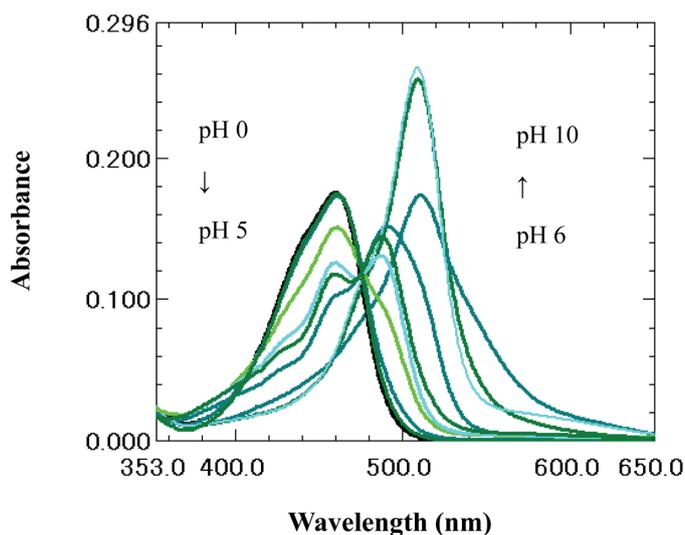


Fig. 3 Absorption spectra of MCPF.

The final concentration is $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$.

The wavelength of the isosbestic points are $\lambda_{i1} = 476 \text{ nm}$ and $\lambda_{i2} = 485 \text{ nm}$.

2-4. *o*-スルホフェニルフルオロン (SPF) と銅 (II) を用いるキニーネ及び関連薬物の吸光度定量法

キニーネは、キナの樹皮に含まれるアルカロイドで、古くより、世界三大感染症の一つマラリアの特効薬とされており、他の合成抗マラリア薬への耐性原虫に対しても広く利用されている⁷⁾。更に薬物としてのみでなく、苦味物質、蛍光標準物質としてなど種々の分野で利用されている重要な化合物である。現在、キニーネの定量法としては、吸光度法、蛍光光度法、原子吸光度法、各種酸化剤を用いたフローインジェクション法、クロマトグラフ法など種々の方法⁸⁾が報告されているが、これらは操作法の煩雑さ、高価な機器の使用など、利便性の面で欠点を有しているため、より簡便、高感度なキニーネの定量法を開発することは、非常に有意義である。

一方、分析化学の分野では、{発色プローブ-金属-被分析物質}の三元錯体の生成反応を利用する分析法が、感度、選択性、簡便性などの面で非常に優れていることが認められている。今回、発色プローブとして、その優位性を認めている *o*-スルホフェニルフルオロン (SPF) と、金属イオンとして銅 (II) [Cu(II)] を併用する三元錯体の生成反応法による簡便、高感度で実用的なキニーネ及びその関連化合物の吸光度定量法の開発を目的として検討したところ、非イオン性界面活性剤の Triton X-305 共存下、発色プローブとして SPF、金属イオンとして銅 (II) との三元錯体生成反応を用いるキニーネ及びその関連化合物の簡便で高感度な吸光度定量法を開発した。(Fig. 4)

検量線を作成したところ、 $0.2 \sim 3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ のキニーネ濃度において良好な直線を得ることができた。定量感度は、モル吸光係数 (ϵ) が 2.0×10^5

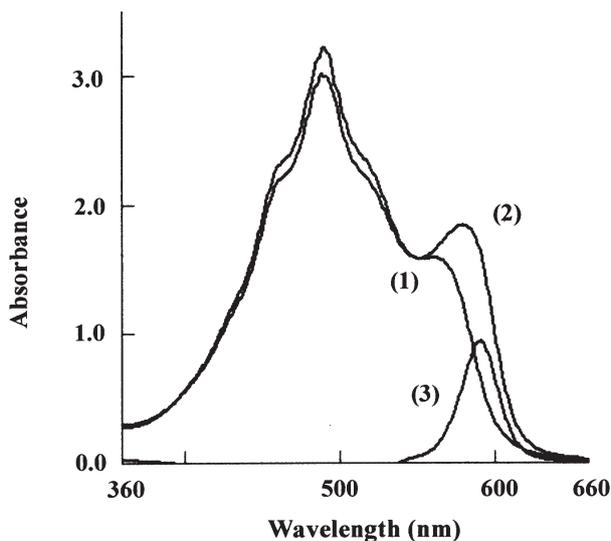


Fig. 4 Absorption spectra obtained by the standard procedure.

Quinine: $2.6 \mu\text{g mL}^{-1}$; Cu (II): $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; SPE: $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; 0.1% Triton X-305; Tartaric acid: $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH 5.4; Reference: water.

(1); SPF-Cu(II) against water.

(2); SPF-Cu(II)-Quinine against water.

(3); SPF-Cu(II)-Quinine against SPF-Cu(II).

$\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 吸光度 0.001 を示す Sandell 表示感度が 1.6 ng cm^{-2} キニーネであり, クロロアニリン酸を用いる電荷移動錯体法の 50 倍, ピロガロールレッド-モリブデン (VI) 錯体法の 40 倍, ブロムフェノールブルーを用いる抽出法の 25 倍, *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン-ウラン (VI) 錯体法, ブロムフェノールブルーとの会合体のサーモクロミズムを利用する抽出法の 5 倍であり,

非常に高感度であった. また, 相対標準偏差 (RSD) は, 2.0% ($n = 6$, $1.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ キニーネ) であり, 再現性にも優れていた. 続いて, キニーネ以外の関連薬物に適用した結果, Table 3 に見られるように, これらも高感度に分析することができた. また, 共存物質の影響を受けにくく, 選択性にも優れていた. 本法を製剤中の薬物分析に応用したところ, Table 4 に示すように測定値及び回

Table 3 Sensitivities, linear ranges and reproducibilities of Quinine and its related drugs

Drug	ϵ^a ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD ^b (%)
Quinine	2.0×10^5	0.2 ~ 3.2	2.0
Quinidine	2.6×10^5	0.5 ~ 1.3	1.8
Chloroquine	6.4×10^4	0.5 ~ 7.8	1.5
Quinacrine	4.2×10^4	0.5 ~ 9.5	1.2

Cu(II): $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; SPE: $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; 0.1% Triton X-305; Tartaric acid: $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH 5.4; Reference: blank solution.

a. molar absorptivity

b. relative standard deviation

Table 4 Application of this method to determination of Quinine and Quinidine in pharmaceutical preparations.

Sample	Content (mg)		RSD ¹⁾ ($n=3$, %)	Recovery ($n=3$, %)
	Nominal amount	Determined amount		
Quinine	1.000	0.998	1.3	100.1
Quinidine	1.000	0.998	1.9	99.7

1) relative standard deviation

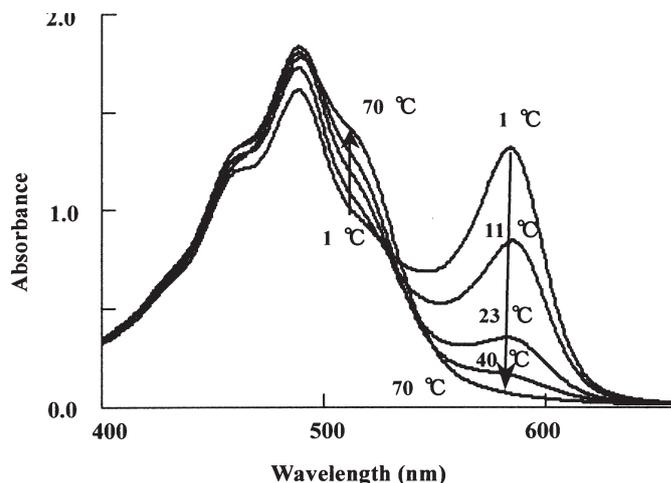


Fig. 5 Change in absorption spectra of the color complex induced by thermochromism. Quinine: $2.6 \mu\text{mL}^{-1}$; Cu(II): $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; SPE: $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; 0.1% Triton X-305; Tartaric acid: $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH 5.4; Reference: water.

収率とも十分満足な結果を得ることができた。加えて、本呈色体の温度変化による色調変化について追跡したところ、Fig. 5に示すように反応溶液の昇温に従い、極大吸収波長 590 nm の吸光度が大きく減少し、それに伴い 510 nm 付近の吸収が増大し、530 nm 付近に等吸収点を認めた。また、この呈色反応は、可逆的変化として観察されるので、[SPF - Cu(II) - キニーネ] 錯体がサーモクロミズムを示すことが推察された。

2-5. SPF の X 線結晶構造解析の検討

X 線結晶構造解析にあたり、合成して得られた沈殿物を DMSO : エタノール = 1 : 1 溶液に溶解し、16°C で蒸気拡散平衡法により 10 日間放置することで赤色状結晶を得た。Fig. 6 に SPF の X 線結晶構造解析の結果を示すが、キサンテン環とベンゼン環が、C9-C6' で単結合した二平面構造を有しており、また C9-C6' の結合距離は $1.492(2) \text{ \AA}$ であり、二平面間の角度は $81.04(4)^\circ$ とほぼ直交して

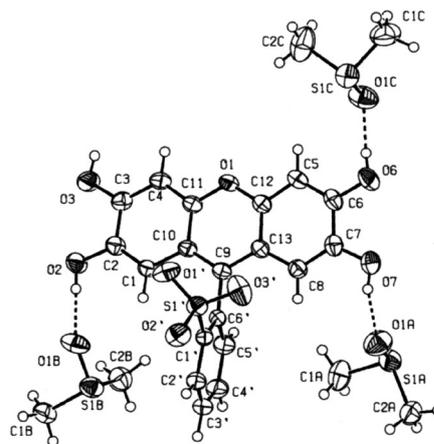
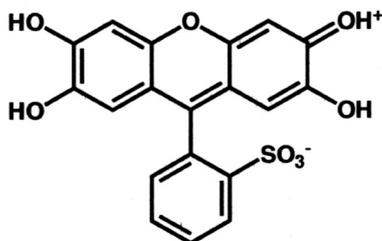


Fig. 6 Crystal structure of SPF.

いた。キサントン環は4つの水酸基を有しており、C2-O2, C3-O3, C6-O6, C7-O7の結合距離は、それぞれ1.355(2), 1.332(2), 1.344(2), 1.348(2) Åであった。SPFは、O1'...O3で分子間水素結合を形成しており、対称構造をもつ二量体を形成し、DMSO分子がSPFの3つの水酸基と水素結合を形成していた。以上の結果より、SPFは、ベンゼン部位のスルホン酸からキサントン環への分子間プロトン移動反応により、"zwitterionic form"をとり、電荷共鳴構造上、安定であることが証明された。

3. キサントン系色素の蛍光プローブへの利用；非対称型キサントン系色素の設計と位置異性体の選択的合成及び光化学的特性

フルオレセイン類やローダミン類をはじめとしたキサントン系色素は、高いモル吸光係数と蛍光量子収率をもち、生体毒性も少ないなどの利点を有しているため、最も汎用されている蛍光プローブ群である⁹⁾。キサントン系色素は、von Baeyerらにより1871年に¹⁰⁾、フルオレセインが合成されて以来、多くの合成法が開発されてきたが、柔軟で簡便な合成スキームが少ないため、蛍光団の積極的な化学構造の変換が行われたことは殆どなく、蛍光性にバリエーションを持たせることは甚だ難しい。また、従来法での非対称型キサントン系色

素の合成においては、縮合反応の際、分離精製が困難な位置異性体が混合するといった問題が生じ¹²⁾、特に、これらプローブが標的化合物と反応する際、蛍光偏光性、分子内消光性や選択性などが位置異性体間で異なるといった報告もある¹³⁾。また、キサントン系色素の光化学的特性は、ベンゼン環部位へ導入する官能基の種類と位置に大いに関係しているため、位置異性体の選択的合成は非常に重要となる。

これらの問題点を解決し、且つ蛍光性及び設計自由度を高める目的で、Fig. 7に示すように分子設計にあたり構造体を3つの部位、1) フェノール部位、2) 蛍光団部位、3) ベンゼン環部位、に分け、化学修飾可能な各部位をそれぞれ組み合わせることで、目的物質を得る合成スキームを考案した。

今回、各種メトキシベンゼン誘導体と塩化ベンゾイル化合物を出発原料として、Friedel-Crafts Acyl化反応により、ベンゾフェノン誘導体(BPs)を合成し、得られたBPsをルイス酸触媒下、フェノール誘導体と加熱縮合反応させることで位置選択的な非対称型キサントン系色素を得ることができた。次いで、合成した色素の光化学的特性について追跡した。更に蛍光団として、フルオレセインとローダミンの構造的ハイブリッドであるRhodol誘導体を合成し、構造と光化学的特性について探索した。続いて、Rhodol誘導体2種の蛍光イメージングプローブとしての評価について、

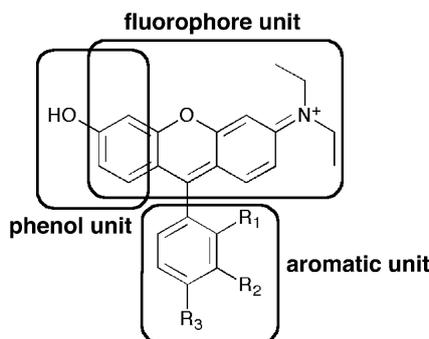


Fig. 7 Molecular design of unsymmetrical xanthene derivatives.

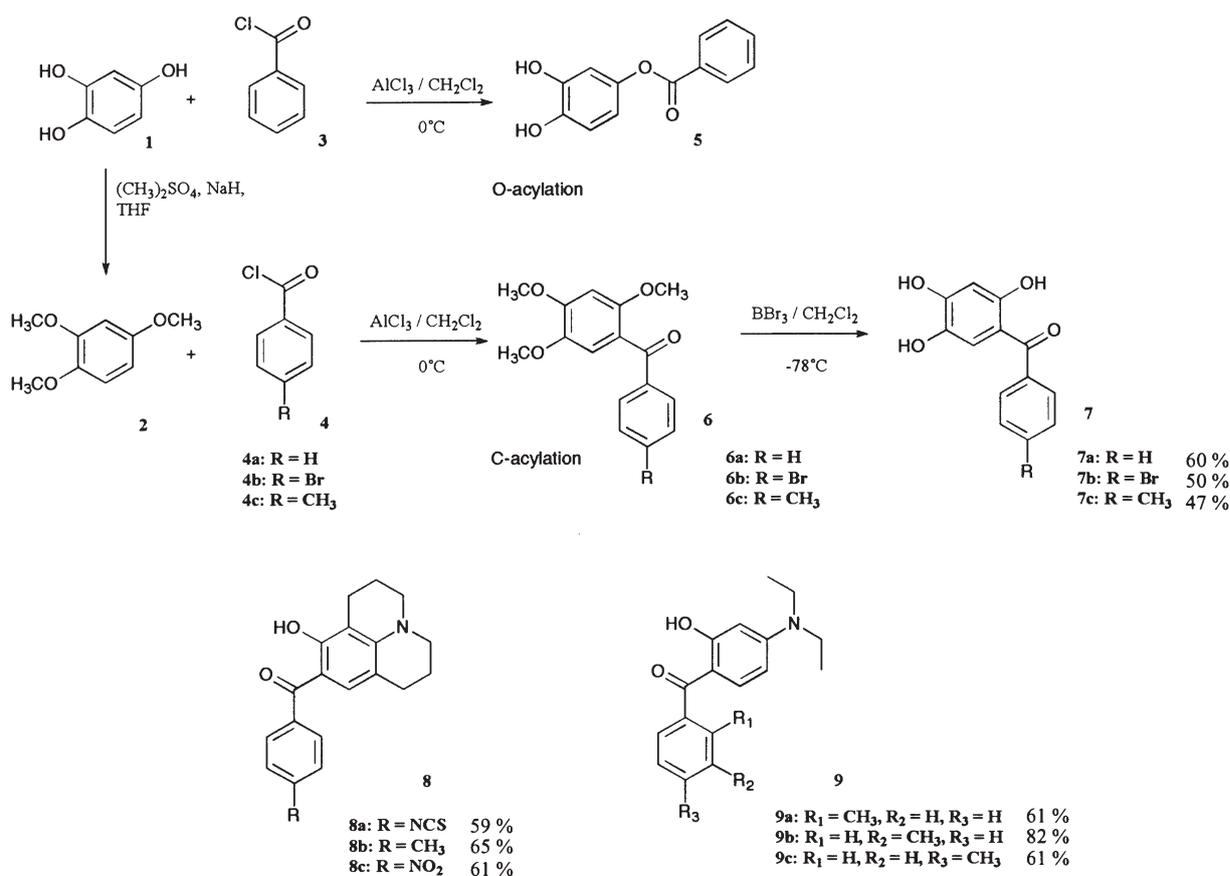
ヒト肺線ガン細胞中で共焦点レーザー顕微鏡を用いて追跡した。

3-1. ベンゾフェノン誘導体の合成 (Scheme 2)

BPsは、フェノール誘導体との縮合反応により、キサンテン骨格を形成する前駆体として知られている。従って、アシル基として塩化ベンゾイル化合物を、ベンゼン環上へ導入することで、位置選択的なベンゾフェノンが合成できると考えられる。今回、 AlCl_3 共存下 0°C における、1,2,4-トリヒドロキシベンゼン **1** と塩化ベンゾイル **3** との反応では、*C*-アシル化体の生成を認めず、4'-*O*-モノアシル化合物 **5** の生成を認めた。そこで、1,2,4-

トリメトキシベンゼン **2** と **3** を用いて反応を行った時、5位選択的な1,2,4-トリメトキシベンゾフェノン **6a** の生成を認めた。他のトリメトキシベンゾフェノン誘導体 **6b-6c** も同様に合成した。

6a-c とも -78°C で BBr_3 により容易に脱保護でき、目的のトリヒドロキシベンゾフェノン誘導体 **7a-c** は再結晶法により得られた。これらの結果に基づき、8-メトキシジュロリジン及び1-ジエチルアミノ-3-メトキシベンゼンと塩化ベンゾイル化合物とのアシル化を検討したところ、アミン結合型ベンゾフェノン (ABPs) **8**, **9** が位置選択的に得られ、ベンゼン環部位の置換基のバリエーションに富んだ化合物を合成することができた。



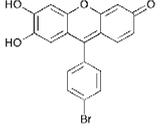
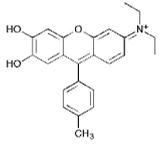
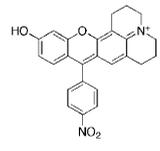
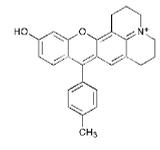
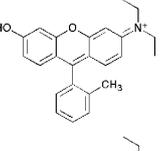
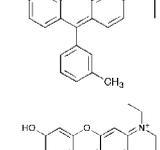
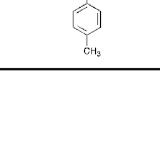
Scheme 2 Synthesis of benzophenone derivatives.

3.2. 非対称型キサントレン系色素の合成

今回、メタンスルホン酸を触媒として用い、合成したベンゾフェノン誘導体とフェノール誘導体の縮合反応を検討し、種々の非対称型キサントレン系色素の合成を行った。ピロカテコール部位を有する非対称型キサントレン系色素を合成する際、セミフルオレセイン化合物である **10** は、**7b** とレスノールとの反応により低収率で生成した。一方、セミローダミン化合物の合成する場合において、**7a-b** と 8-ヒドロキシジュロリジン及び 1-ジ

エチルアミノ-3-ヒドロキシベンゼンとの縮合反応を検討したところ、単離精製不可能な副生成物が得られ、目的化合物は全く得られなかった。しかしながら、ベンゾフェノンを **8** 及び **9** に変更し、縮合反応を試みたところ、80~150℃の条件で、種々のセミローダミン化合物を生成するという興味ある結果を得ることができた。この詳細な反応機構は現在のところ不明であるが、セミローダミン化合物の合成において、ABPs は有用であることが認められた。一方、ベンゼン部位のオル

Table 5 Synthesis of unsymmetrical xantheno derivatives.

reaction no	phenol	benzophenone	product	yield (%)
1	resorcinol	7b	 10	10
2	1,2,4-trihydroxybenzene	9c	 11	12
3	resorcinol	8c	 12	11
4	resorcinol	8b	 13	52
5	resorcinol	9a	 14	9
6	resorcinol	9b	 15	75
7	resorcinol	9c	 16	43

ト位に置換基を有する場合、他のメタ位やパラ位と比較して非常に低収率であった。これらの結果を Table 5 に示す。

3-3. 非対称型キサントン系色素の光化学的特性

合成した非対称型キサントン系色素の紫外可視吸収スペクトル及び蛍光スペクトルを測定した。(Fig. 8) また、蛍光団として Rhodol 誘導体の位置異性体間での光化学的特性も評価した。浦野らは、フルオレセインが溶液中で高い蛍光量子収率を示すには、カルボン酸の導入は必ずしも必要でなく、メチル基やメトキシ基などの電子供与基の導入においても可能であること、また、これら官能基のオルト位への導入により、キサントン環部位とベンゼン環部位がほぼ直交することが必要であると

提唱している。¹⁴⁾ 今回、複雑な分子種の生成を抑える目的で、ベンゼン環部位へ位置選択的にメチル基を導入した Rhodol 誘導体を合成し、エタノール中でのモル吸光係数 (ϵ) 及び絶対蛍光量子収率 (Φ_f) をそれぞれ測定し、これらの結果を Table 6 に示す。フルオレセインのオルト位体が、メタ位及びパラ位体と比較して、蛍光特性が優れているのは、リンカーを介したベンゼン環部位の立体的な回転の抑制による蛍光団の無輻射遷移確率の低下と考えられるが、本実験においても同様に、オルト位の Φ_f は、メタ位及びパラ位より高い結果を得た。しかしながら、Rhodol を母核とする場合、既存のフルオレセイン化合物と比べ、位置異性体間での蛍光特性に大きな変化は見られなかった。¹¹⁾

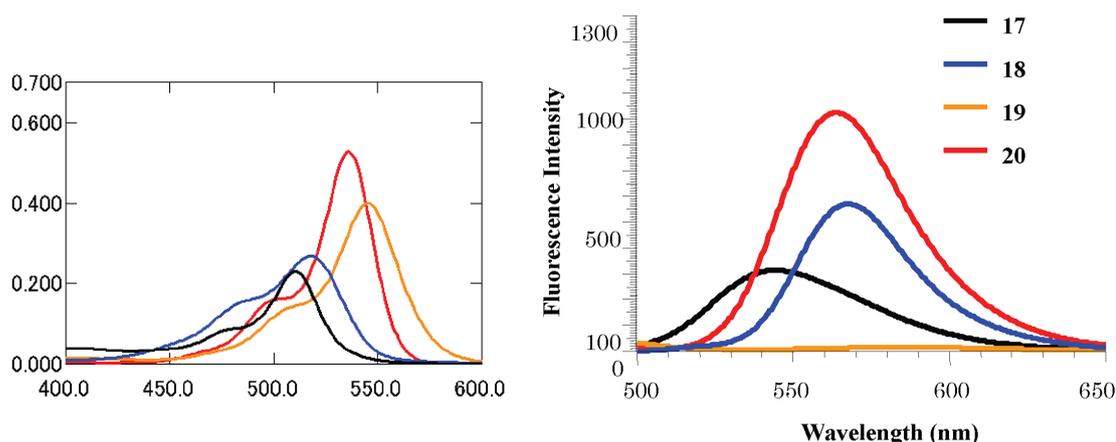


Fig. 8 (a) Absorption spectra and (b) Fluorescence emission spectra, of unsymmetrical xanthene derivatives.

Table 6 Photochemical properties of regioisomers of rhodol derivatives.

	Yield	absorption maximum (nm) ^a	$\epsilon (\times 10^4)^a$	emission maximum (nm) ^a	Φ_f^{a-c}
21	9	523	8.5	555	0.706 / 0.708
22	75	523	8.4	557	0.592 / 0.602
23	43	523	9.4	556	0.599 / 0.613

^a Measured in ethanol. ^b Excited at 480 nm. ^c Left values indicate Φ_f measured in ethanol solution and right values indicate Φ_f after excluding O_2 effect by bubbling N_2 in ethanol solution.

3.4. 生細胞中の蛍光イメージング

合成した **13** 及び **16** の蛍光イメージングは、ヒト肺線ガン細胞 A549 を用いて行った。 **13** 及び **16** の純度は、逆相 HPLC により確認した。 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ の **13** と **16** を細胞中にローディングし、 37°C で 30 分間インキュベートした後、 Opti-MEM 緩衝液で十分に洗浄し、細胞外の **13** 及び **16** を完全に除去した。細胞内画像は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。 **13** 及び **16** はいずれの細胞とも、細胞膜を容易に透過し、サイトゾルに局在した。また異なった励起光の照射により、蛍光団の電子共役系に由来した二波長の [フルレセイン (緑), ローダミン (赤)] 特徴的な画像を観察した。 (Fig. 9) このような一つの分子が異なる 2 波長の蛍光性を有する Rhodol 誘導体は、コントラストの上昇やマルチカラー解析が多様になり、また非常に広い励起波長と蛍光波長をもつため、

標的化合物との反応によりいずれかの波長が変化するようなりガンドの分子設計と Rhodol 誘導体への導入により、2 波長励起 1 波長蛍光検出や 1 波長励起 2 波長蛍光検出などのレシオ測定が可能となる。加えて、観測域が広範囲で、pH などの環境依存性による光褪色性が少ないなどの特性を有するため、新たな蛍光団として今後、優れた機能性を有する Rhodol 誘導体の創製が望まれる。

4. 結語

キサンテン系色素の分析化学的ツールとしての利用面での考案と新しい機能性色素の創製を目的として探査した本研究において、以下のような知見を得る事ができた。

まず、発色プローブである PFs を合成し、それらを二元及び三元錯体生成反応系へ適用し、金属

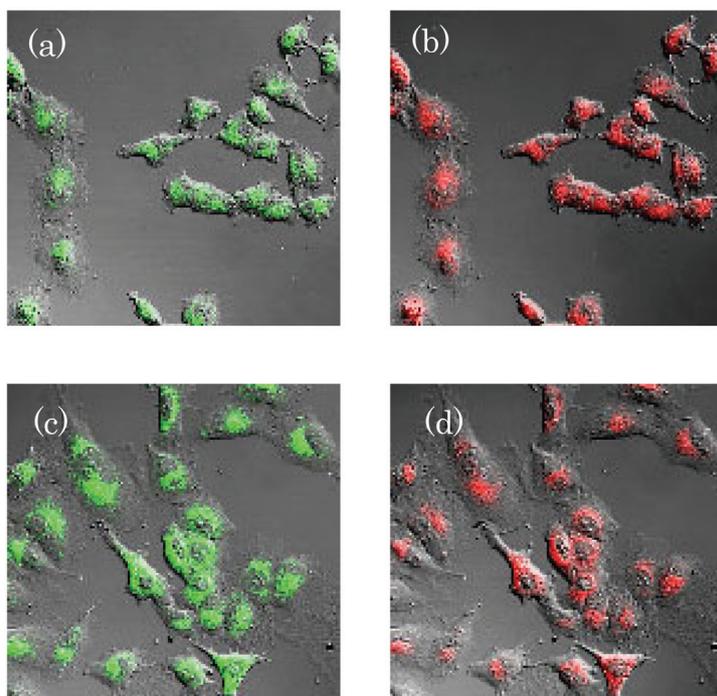


Fig. 9 Top: Fluorescence images of live cells loaded with $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ Compound **13**. (a) Excited at 506 nm and (b) excited at 560 nm. Bottom: Fluorescence images of live cells loaded with $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ Compound **16**. (c) Excited at 488 nm and (d) excited at 543 nm..

イオンとしてアルミニウム, 医薬品としてキニーネの簡便, 高感度かつ選択的な吸光光度定量法を開発した. また, PFs の構造化学的キャラクタリゼーションを行い, その発色性は pH 依存的で, かつベンゼン環部位への導入する官能基の位置と種類により, 形成する化学種が複雑化するという知見を得た.

続いて, キサンテン系色素の蛍光プローブへの利用について, まず非対称型キサンテン系色素の設計と位置異性体の選択的合成法の開発を行い, 合成した誘導体の光化学的特性と蛍光イメージングプローブとしての有用性について検討した.

今回, 開発した合成法は, ① 蛍光団の化学構造変換が容易であるため, 多様な蛍光性を有した誘導体の合成が可能である ② ベンゼン環部位の官能基を位置選択的に導入できる といった点で既存法と比べ利点をもつため, 新たな合成法として非常に有用であることが示唆される. また本法より, 合成した Rhodol 誘導体は, 1 分子でフルオレセインとローダミンの 2 波長の蛍光を有するため, この光化学的特性を巧みに利用した新たな蛍光団となりうることを期待される. 加えて, Rhodol 単体の細胞膜透過性や細胞内局在性も良好で, pH などの環境依存性も低いいため, イメージングへの応用も十分可能であることが明らかとなった.

以上, 本研究結果から, キサンテン系色素が分析化学を進展させる光化学プローブとして, 非常に有用であることが示唆された.

今後は, 筆者が開発した合成法を更に発展させ, 生体分子を選択的に認識する光化学プローブの創製と分析手法の開発を行い, ケミカルバイオロジーの発展に寄与したいと考える.

REFERENCES

- (a) 中澄博行, "機能性色素のはなし", (2005), (裳華房). (b) 鈴木祥夫, 鈴木孝治, 化学工業, 55, 10 (2004).
- (a) 三輪佳宏, "蛍光・発光試薬の選び方と使い方", (2007), (羊土社). (b) 松岡賢, "色素の科学と応用", (1994), (大日本図書).
- 藤田芳一, 生体成分と医薬品の吸光光度分析 (進歩総説), ぶんせき, **11**, 596-602 (2008).
- (a) Roberts N. M., Clough A., Bellia J. P., Kim J. Y., *J. Inorg. Biochem.*, **69**, 171-176 (1998). (b) Fattoretti P., Freddari B., Baliotti M., Moccheduani E., Scancar J., Zambenedetti P., Zatta P., *J. Alzheimers. Dis.*, **5**, 437-444 (2003). (c) Flaten T. P., Alfrey A. G., Birchall J. D., Savory J., Yokel R. A., *J. Toxicol. Environ. Health.*, **48**, 527-542 (1996). (d) World Health Organization, Environmental Health Criteria 194, Aluminium, Genova: WHO, (1997).
- (a) Alderman F. R., Gitelman H. J., *Clin. Chem.*, **26**, 258-260 (1980). (b) Bettinelli M., Baroni U., Fontana F., Poisetti P., *Analyst (London)*, **110**, 19-22 (1985). (c) Leung F. Y., Henderson A. R., *Clin. Chem.*, **28**, 2139-2143 (1982). (d) Frech W., Cedergren A., Cederberg C., Vessman J., *Clin. Chem.*, **28**, 2259-2263 (1982).
- Marczenko Z., Jarosz M., *Analyst (London)*, **107**, 1431-1438 (1982).
- 池澤宏郎, "21 世紀の考える薬学微生物学", (2002), (廣川書店).
- (a) 大野典子, 酒井忠雄, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **34**, 695-700 (1985). (b) 森逸男, 藤田芳一, 坂口紀美子, 坪根朋子, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **30**, 679-682 (1981). (c) Montagu M., Levillain P., Rideau M., Chènieux J. C., *Talanta*, **28**, 709-716 (1981). (d) Kirkbright G. F., Narayanaswamy R., *Analyst (London)*, **97**, 174-181 (1972). (e) Yebra M. C., Cespon R. M., *Microchem. J.*, **65**, 81-86 (2000). (f) Xingwang Z., Zhujun Z., *Anal. Sci.*, **16**, 1345-1348 (2000). (g) Samanidou F. V., Evaggelopoulos N. E., Papadoyannis N. L., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**, 21-28 (2005).
- (a) Wongkongkatep J., Miyahara Y., Ojida A., Hamachi I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 665-668 (2006). (b) Takakusa H., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Nagano T., *Anal. Chem.*, **73**, 939-942 (2001). (c) Kikuchi K.,

- Komatsu K., Nagano T., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 182-191 (2004). (d) Martinez-Manez R., Sancenon F., *Chem. Rev.*, **103**, 4419-4476 (2003).
- 10) Baeyer A. V., *Chem. Ber.*, **5**, 255 (1871).
- 11) (a) Yang Y., Lowry M., Schowalter C. M., Fakayode S. O., Escobedo J. O., Xu X., Zhang H., Jensen T. J., Fronczek F. R., Warner I. M., Strongin R. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 14081 -14092 (2006). (b) Yang Y., Escobedo J. O., Wong A., Schowalter C. M., Touchy M. C., Jiao L., Crowe W. E., Fronczek F. R., Strongin R. M., *J. Org. Chem.*, **70**, 6907-6912, (2005). (c) Bacci J. P., Kearney A. M., Van-Vranken D. L., *J. Org. Chem.*, **70**, 9051-9053 (2005). (d) Jiao G. S., Castro J. C., Thoresen L. H., Burgess K., *Org. Lett.*, **5**, 3675-3677 (2003). (e) Shi J., Zhang X., Neckers D. C., *J. Org. Chem.*, **57**, 4418-4421, (1992). (f) Sano H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **31**, 974-980, (1958).
- 12) (a) Honda K., Nakata E., Ojida A., Hamachi I., *Chem. Comm.*, **38**, 4024-4026, (2006). (b) Liu J., Diwu Z., Leung W. Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2903-2905 (2001). (c) Whitaker J. E., Haugland R. P., Ryan D., Hewitt P. C., Haugland R. P. Prendergast F. G., *Anal. Biochem.*, **207**, 267-279 (1992).
- 13) (a) Hirayama T., Iyoshi S., Taki M., Maeda Y., Yamamoto Y., *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 2040-2045 (2007). (b) Buolamwini J. K., Craik J. D., Wiley J. S., Robins M. J., Gati W. P., Cass C. E., Paterson A. R. P., *Nucleosides Nucleotides*, **13**, 737-751 (1994).
- 14) Urano Y., Kamiya M., Kanda K., Ueno T., Hirose K., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4888-4894 (2005).