

## アミノ酸と相互作用するフタロシアニンの合成と配位特性

松井 栄樹\*、加藤 岳流、渡辺 絢晴、柳田 琉偉

福井工業高等専門学校 物質工学科 (〒916-8507 福井県鯖江市下司町)

\*eiki@fukui-nct.ac.jp

### Synthesis and coordination properties of phthalocyanines that interact with amino acids

Eiki MATSUI\*, Takeru KATO, Kensei WATANABE and Rui YANAGIDA

Department of Chemistry and Biology, National Institute of Technology, Fukui College  
(Geshi, Sabae, Fukui 916-8507, Japan)

(Received August 27, 2021; Accepted September 26, 2021)

#### Abstract

The synthesis and characterization of new functionalized phthalocyanines (**ZnPc**, **MgPc**) with directly appended amino moieties are described. These phthalocyanine compounds (Pcs) contain external binding sites, and each of them is formed by nitrogen atoms. The synthesis of Pcs was carried out in two stages, and the formation of Pcs was confirmed by  $^{13}\text{C}$ -NMR and MALDI-MS measurement. Additionally, ESI-MS spectra of Pcs containing amino acids also indicated the formation of an amino acid-phthalocyanine complex coordinated from the outside and the metal. The design strategy of the Pcs helped to extend the development of a phthalocyanine-based cancer photodynamic therapy (PDT).

**Keywords:** Phthalocyanine, Binding Sites, Amino Acid Interaction, ESI-MS Spectra

#### 1. 緒論

フタロシアニンはヘモグロビンや種々の酸化酵素にみられるポルフィリンに類似した構造を持ち、分子構造は平面性が高く、各種金属や置換基を導入することができる。そのため、目的に応じた金属化合物の合成が可能であり、電子移動を伴う酸化還元触媒としての多種多様

な触媒作用が期待できるとともに[1]、これらの特徴を生かして、触媒、吸着剤としてだけでなく癌のレーザー治療、太陽電池・燃料電池、エネルギー変換材料、半導体、表示材料、情報記録材料など様々な用途に用いられている[2]。

フタロシアニンは通常中心にのみ金属配位能をもつが、我々の研究室では外部のヘテロ環とメソ位の3ヶ所

の窒素原子の孤立電子対を利用した外部配位サイトを導入し、各種金属の配位特性の調査を行ってきた(図1)[3]。この外部配位サイトを有するフタロシアニンは、環外部のピラジン骨格の側鎖 R に置換基を導入することにより機能特性を変化させ、配位した金属イオンや他の分子と相互作用することが出来る。これまでフタロシアニンを有機溶媒に溶けやすくするために側鎖 R に主に炭素鎖を導入して各種特性の調査を行ってきた[3]。

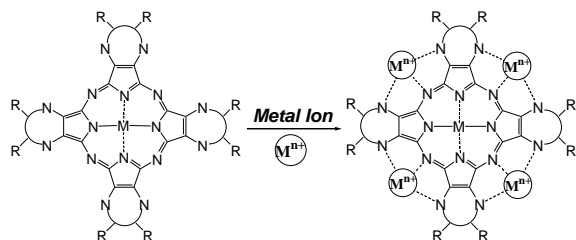


図1 フタロシアニン外部配位サイトへの金属配位様式

一方、極性置換基であるアミノ基[4]、水酸基[5]等をポルフィリン、フタロシアニンに導入し、弱い相互作用によりフタロシアニンの二量体化や細胞への取り込みを促進させる試みが近年行われている。これらの手法により、本来有機溶媒にしか溶解しないフタロシアニンを水溶性へと変換させ、また極性基を有する化合物との相互作用を可能にできる。

そこで本研究では、まず、これまで炭素鎖を導入してきた側鎖 R に極性基であるアミノ基を導入した、外部配位サイトを有するフタロシアニンを合成することを目的とした。また、フタロシアニンへの極性基の導入により起こると考えられる、アミノ酸等の有機極性分子との相互作用について、ESI-MS 測定により検出できるかどうか検討することを目的として実験を行った。

## 2. 実験

### 2.1 アミノ基を分子内に有するフタロシアニン (MgPc, ZnPc) の合成

合成するフタロシアニンは、ピラジンにアミノ基を導入した後に閉環することで、フタロシアニン骨格のメソ位の窒素原子、環外のピラジン環の2つの窒素原子の計3つの窒素原子からなる外部配位サイトが形成されるとともに、極性基としてジエチルアミノ基が8つ導入されたフタロシアニンが合成できる(図2)。ジエチルアミノ基を有するこ

とにより、多くの極性有機分子と相互作用が可能になり[6]、弱酸性でプロトン化されて水溶化すると考えられる。

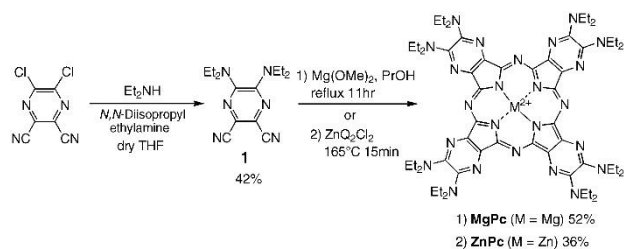


図2 アミノ基を有するフタロシアニンの合成ルート

フタロシアニンの前駆体であるジシアノ体1の合成は、5,6-Dichloro-2,3-dicyanopyridazine 2 gをdry THF 80 mLに溶かし、続けてDiethylamine 3.48 mL、N,N-Diisopropylethylamine 6.44 mLを加え、11時間室温で攪拌させて行った[6]。反応液をアセトンでろ過、エバポレート後に得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィー(展開溶媒はHexane:AcOEt = 10:1)により精製し、ジシアノ体1を42%で得た。得られた生成物はAPCI-MS測定、重クロロホルムを溶媒に用いた<sup>1</sup>H-NMR測定、<sup>13</sup>C-NMR測定により同定を行った。以下に各測定結果を示す。

APCI-MS 測定の結果より、ジシアノ体1の理論質量272.2にH<sup>+</sup>が付加した質量が273.1に観測された。また<sup>1</sup>H-NMR 測定の結果より、エチル基水素の3H分のシグナルが1.03 ppm, 2H分が3.44 ppmに観測された。また、図3に示すジシアノ体1の<sup>13</sup>C-NMR 測定の結果より、第4級炭素のシグナルが146.2, 120.3, 115.0に3本とエチル基炭素のシグナルが42.9, 12.8 ppmに観測され、これらより、目的のジシアノ体1の生成が確認された。

続いて、得られたジシアノ体1を用いてMgPcの合成を行った。100 mL ナスフラスコにジシアノ体1を281 mg入れ、dry PrOH 20 mLで溶解し、Mg(OMe)<sub>2</sub> 0.68 mLを加えて窒素気流下で11時間加熱還流した。室温に冷却後、青紫色の反応溶液に蒸留水を加えて沈殿を生成させ、ろ過、蒸留水で洗浄後に真空乾燥をしてMgPcを52%で得た。重クロロホルムを溶媒に用いた<sup>13</sup>C-NMR 測定、MALDI-MS 測定により同定を行った。

図3に示すMgPcの<sup>13</sup>C-NMR 測定の結果より、第4級炭素のシグナルが167.6, 150.3, 136.4に3本とエチル基炭素のシグナルが42.9, 13.1 ppmに観測された。また、MALDI-MS 測定の結果、1113.98にMgPc C<sub>56</sub>H<sub>80</sub>N<sub>24</sub>Mg (Exact Mass: 1112.68)がプロトン化したシグナルが観測され、目的のフタロシアニンMgPcの生成が確認された。

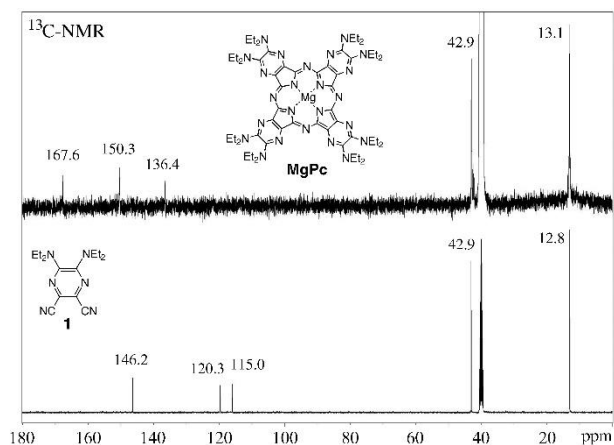


図3 ジシアノ体1とMgPcの $^{13}\text{C}$ -NMR測定結果

続いて、得られたジシアノ体1を用いてZnPcの合成を行った。25 mL ナスフラスコにジシアノ体1を281 mg 入れ、一当量の $\text{ZnQ}_2\text{Cl}_2$  406 mg を $165^\circ\text{C}$ 、 $\text{N}_2$ 気流下で11時間攪拌し、室温に冷却後、青緑色の反応物に酢酸エチルを加えて懸濁、沈殿をろ過、酢酸エチル、蒸留水で洗浄後に真空乾燥をしてZnPcを36%で得た。MALDI-MS測定により同定を行ったところ、1153.98にZnPc  $\text{C}_{56}\text{H}_{80}\text{N}_{24}\text{Zn}$  (Exact Mass: 1152.63)がプロトン化したシグナルが観測され、目的のフタロシアニンZnPcの生成が確認された。

## 2.2 ESI-MS測定によるフタロシアニン(MgPc, ZnPc)とアミノ酸との相互作用の確認

得られた相互作用可能なフタロシアニンMgPcおよびZnPcを用いて、アミノ酸の一種であるアルギニンを追加して相互作用の様子をESI-MSにより確認を行った(図4)。実験は2.5%の $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ を添加した、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ と $\text{CH}_3\text{OH}$ が1:1の測定溶媒にフタロシアニンを $5 \times 10^{-4}$  Mの濃度で溶解したものをを用いて行った。その結果、ESI-MSをNegativeモードで測定したところ、ZnPcのみの測定では $\text{Cl}^-$ が付加したイオン $[\text{ZnPc}+\text{Cl}]^-$ が1189.7に観測された。続いてアルギニンを一当量添加して測定したところ、ZnPcにアルギニンが相互作用したイオン $[\text{ZnPc}+\text{Arg}-\text{H}]^-$ が1325.8に確認され、理論質量およびマスパターンと良い一致を示した。また同時に測定溶媒中の酢酸が相互作用したイオン $[\text{ZnPc}+\text{CH}_3\text{CO}_2]^-$ が1211.6に観測された。また、同様にMgPcのみの測定では $\text{Cl}^-$ が付加したイオン $[\text{MgPc}+\text{Cl}]^-$ が1147.8に観測された。続いてアルギニンを一当量添加して測定したところ、

MgPcにアルギニンが相互作用したイオン $[\text{MgPc}+\text{Arg}-\text{H}]^-$ が1285.4に確認され、理論質量およびマスパターンと良い一致を示した。また、同様に測定溶媒中の酢酸が相互作用したイオン $[\text{MgPc}+\text{CH}_3\text{CO}_2]^-$ が1171.2に観測されたが、ZnPcの場合と比較すると強度が弱く、また他のシグナルとの強度比から、MgPcはアルギニンと強く相互作用していることが明らかとなった。相互作用の違いについて、中心金属の $\text{Zn}^{2+}$ は中間的な酸に属するが $\text{Mg}^{2+}$ は硬い酸に属するため、HSAB理論に基づきアミノ酸の硬い塩基部分であるアミノ基やカルボキシル基との相互作用が強いと考えられる[7]。

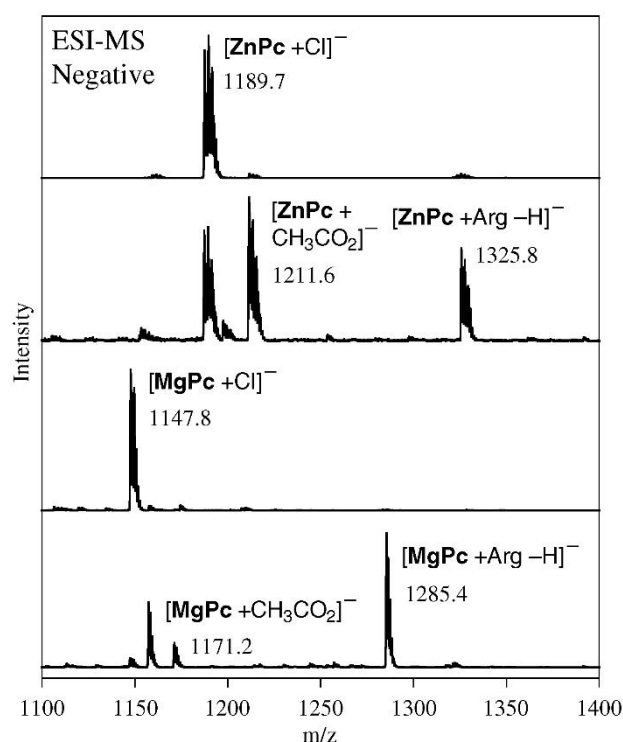


図4 ZnPc, MgPcとArgの相互作用のESI-MS測定結果

続いて、MgPcと他のアミノ酸との相互作用を確認するため、同様の実験をヒスチジン、セリン、システインを用いて行った(図5)。その結果、同様にMgPcにヒスチジンが相互作用したイオン $[\text{MgPc}+\text{His}-\text{H}]^-$ が1266.3、セリンが相互作用したイオン $[\text{MgPc}+\text{Ser}-\text{H}]^-$ が1216.2、システインが相互作用したイオン $[\text{MgPc}+\text{Cys}-\text{H}]^-$ が1232.3に確認され、若干の相互作用の割合は異なるものの、いずれも理論質量およびマスパターンと良い一致を示した。

また、チロシン、リジンを用いて行った場合には、疎水性が強くなるため、アミノ酸と相互作用したイオンの割合が1/3程度に低下する現象が確認でき、チロシンが相互作

用したイオン[MgPc+Tyr-H]<sup>-</sup>については1292.7、リジンが相互作用したイオン[MgPc+Lys-H]<sup>-</sup>が1257.4に確認できた。

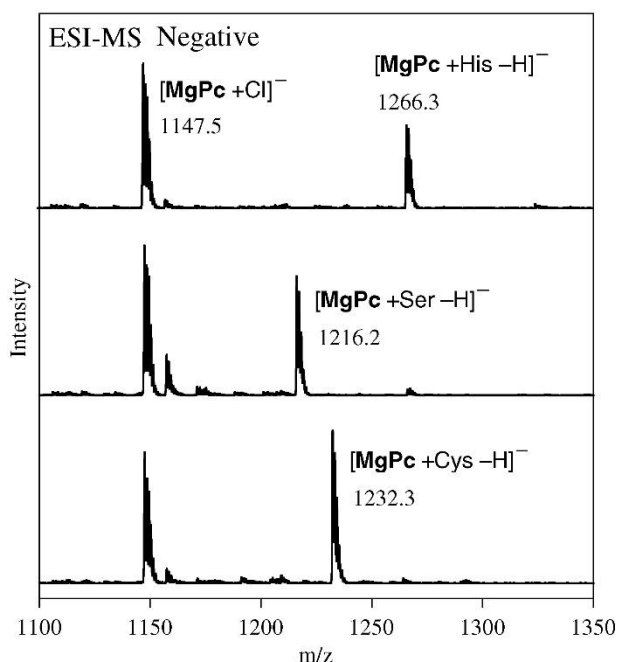


図5 MgPc と His, Ser, Cys の相互作用の ESI-MS 測定結果

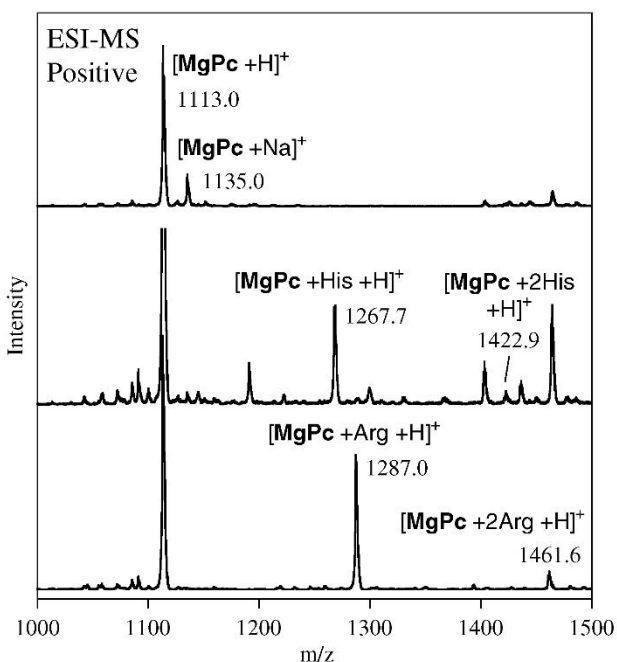


図6 MgPc と His, Arg の相互作用の ESI-MS 測定結果

続いて、ESI-MSをPositiveモードで測定したところ、MgPcのみの測定ではH<sup>+</sup>が付加したイオン[MgPc+H]<sup>+</sup>が1113.0、Na<sup>+</sup>が付加したイオン[MgPc+Na]<sup>+</sup>が1135.0に観測された(図6)。続いてヒスチジンを一当量添加して測定

したところ、MgPcにヒスチジンが一分子相互作用したイオン[MgPc+His+H]<sup>+</sup>が1267.7に確認され、二分子相互作用したイオン[MgPc+2His+H]<sup>+</sup>も1422.9に確認できた。また、アルギニンを、一当量添加して測定したところ、MgPcにアルギニンが一分子相互作用したイオン[MgPc+Arg+H]<sup>+</sup>が1287.0に確認され、二分子相互作用したイオン[MgPc+2Arg+H]<sup>+</sup>が1461.6、三分子相互作用したイオン[MgPc+3Arg+H]<sup>+</sup>が1635.4に確認でき、複数のアミノ酸がMgPcと相互作用している様子が確認できた。

### 3. 結論

これまで側鎖に炭素鎖を導入してきたフタロシアニンに対し[3]、新たにアミノ基を導入したフタロシアニンの合成と同定を行った。中心金属としてMg<sup>2+</sup>とZn<sup>2+</sup>を導入し、それぞれのPcに対してアミノ酸であるアルギニンを相互作用させたところ、HSAB理論に基づきMgPcとの相互作用が強いことが明らかとなった。これはフタロシアニン外部の極性基部分だけでなく中心金属も相互作用に関与し、ESI-MS測定にて相互作用の状態が観測できることを示している。

ESI-MS測定にはPositiveモードとNegativeモードの2種類があり、プラスのイオン種とマイナスのイオン種が測定可能である。種々のアミノ酸との相互作用をESI-MS測定にて確認したところ、多くのアミノ酸はNegativeモードにて感度よく相互作用したイオン種が確認でき、相互作用していない[MgPc+Cl]<sup>-</sup>のシグナルとの強度比較をすることで、相互作用の状態を見積もることができる。また、Positiveモードでは、プロトン化しやすい側鎖を持つアミノ酸に対象は限られるが、同様に相互作用の様子を観測でき、アミノ酸が二分子相互作用しているイオン種も観測できた。

これらの結果は、今後フタロシアニンと極性基を有する生体分子との相互作用、細胞への取り込みを評価するうえで、基盤となるものと考えられる。

謝辞 本研究はJSPS科研費JP21K12741の助成を受けたものである。

### 引用文献

- 1) S. V. Kudrevich, J. E. van Lier, *Coord. Chem. Rev.*, **156**, 163-182 (1996).
- 2) 詫摩啓輔, 藤井志朗「わかりやすい機能性色素材料」

- 工業調査会 (1999).
- 3) E. Matsui, I. Hirazawa and M. Kobayashi, *Journal of Ecotechnology Research*, **15**, 1-4 (2009).
- 4) X. S. Li, J. Guo, J. J. Zhuang, B. Y. Zheng, M. R. Ke, J. D. Huang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 2386-2389 (2015).
- 5) J. Y. Liu, P. C. Lo, X. J. Jiang, W. P. Fong and D. K. P. Ng, *Dalton Trans.*, 4129-4135 (2009).
- 6) V. Novakova, P. Zimcik, K. Kopecky, M. Miletin, J. Kunes and K. Lang, *Eur. J. Org. Chem.*, 3260-3263 (2008).
- 7) A. M. Garcia, F. J. R.-Salguero, D. M. Bassani, J.-M. Lehn, G. Baum, D. Fenske, *Chem. Eur. J.*, **5**, 1803-1808 (1999).