

# 水溶性フラーレンの設計とそれらを用いた抗酸化作用に関する研究

東京工業大学物質理工学院

道信 剛志

The radical scavenging properties of fullerene ( $C_{60}$ ) have attracted much attention with a view to commercialization. However, a hydrophobic feature of  $C_{60}$  made it difficult to homogeneously distribute in an aqueous solution. In order to increase the water solubility, chemical modification was often adopted. Alkyne-appended  $C_{60}$  derivative was synthesized by a Bingel method. The alkyne moiety of this  $C_{60}$  derivative was further functionalized by the Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction. Azide-substituted poly(ethylene glycol) (PEG) was attached to the  $C_{60}$  derivative by CuAAC, yielding PEGylated  $C_{60}$ . Although sufficiently long PEG with the molecular weight of 5000 was employed, the PEGylated  $C_{60}$  was not soluble in water but soluble in methanol. The high solubility in methanol allowed for the evaluation of radical scavenging properties. When a solution of PEGylated  $C_{60}$  in methanol was added to a mixed aqueous solution of  $\beta$ -carotene and linoleic acid, the peroxide attack to  $\beta$ -carotene was clearly suppressed. This was due to the radical scavenging property of the  $C_{60}$  derivative. This suppression effect became stronger when the concentration of PEGylated  $C_{60}$  increased. This result again supports the radical scavenging property of PEGylated  $C_{60}$  derivative and poses the potential use as an antioxidant.

## 1. 緒言

フラーレン ( $C_{60}$ ) は優れたラジカル補足能を有しているため抗酸化剤としての応用が期待されている<sup>1)</sup>。しかし、水への溶解性が極めて低いため、生体高分子との複合化は困難であった。表面に多数の水酸基を導入した水溶性フラーレンは「ラジカル・スポンジ」という商標名が与えられており、優れたラジカル補足能を有することが実証済みである<sup>2)</sup>。そのため、水溶性フラーレンを配合した化粧品は既に市販されており、肌の老化防止と美白効果を増進すると謳われている。水溶性フラーレンは一般的にビタミンCの172倍の抗酸化作用、プラセンタの800倍のコラーゲン生成促進能を有すると言われている。しかし、「ラジカル・スポンジ」の化学構造では $C_{60}$ の $\pi$ 共役系はほとんど完全に断絶されており、それにともない抗酸化作用に代表されるフラーレンの特性が失われていると考えられる。この問題を解決するために、フラーレンを希望の置換基で化学修飾する道筋がしばしば採用される<sup>3)</sup>。例えば、巨大な水溶性(高)分子鎖をフラーレンに置換することで水溶性の問題は解決できることが知られているが、置換基の分子量が大きくなるとフラーレン密度が低下するという新たな問題が生じる。本研究では、 $C_{60}$ に水溶性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)を連結することでメタノールへの

溶解性を付与することに成功した。また、PEG鎖の長さが溶解性を大きく左右することを明らかにした。得られたPEG-フラーレン誘導体の抗酸化作用を評価することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. 試薬

フラーレン誘導体**1**は文献に従い、合成した<sup>4)</sup>。その他の試薬は関東化学、東京化成工業、Aldrichより購入し、そのまま使用した。

### 2.2. 合成

50 mLナス型フラスコにフラーレン誘導体**1** (24 mg, 0.022 mmol) と THF (7.2 mL) を加えた後、0 °C で攪拌した。テトラ-*n*-ブチルアンモニウムフルオリドの THF 溶液 (1 M, 0.055 mL) を加え、0 °C のままで 1.5 時間攪拌した。室温に戻した後、塩水 (200 mL) を加え、有機層のみをクロロホルム (400 mL) で抽出した。抽出した有機層はさらに塩水 (200 mL) で 2 回洗浄した後、硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。ろ過して硫酸ナトリウムを除去した後、エバポレーションによりろ液を約 15 mL に濃縮した。ここへメトキシポリエチレングリコールアジド 5000 (111 mg, 0.0222 mmol) と Cu (PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Br (2.06 mg, 0.00221 mmol) を加えた後、窒素雰囲気下、60 °C で 22 時間攪拌した。室温に冷却した後、クロロホルムと水を加え、有機層を水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過により硫酸ナトリウムを除去した後、エバポレーションして溶媒を留去した。最後にカラム精製 (Bio-Beads S-X1, クロロホルム) により精製し、目的化合物を得た (89 mg, 68%)。得られたフラーレン誘導体はメタノールに可溶であったが、20 ~ 37 °C



Design and Antioxidative Effects of Water Soluble Fullerenes

Tsuyoshi Michinobu

Department of Materials Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology Tsuyoshi Michinobu

の温度範囲で水には不溶であった。

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.44\text{-}2.29$  (m, 7H), 3.37 (s, 3H), 3.44–3.80 (m, 4 (n+1) H), 4.29 (br s, 4H), 7.68 ppm (br s, 1H); IR (neat): 3243.7, 2884.0, 2130.0, 1717.3, 1591.0, 1483.0, 1466.6, 1451.2, 1358.6, 1342.2, 1280.5, 1241.0, 1144.6, 1105.0, 1060.7, 1006.7, 962.3, 879.4, 841.8, 717.4, 700.0, 664.4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2. 3. 抗酸化作用の評価

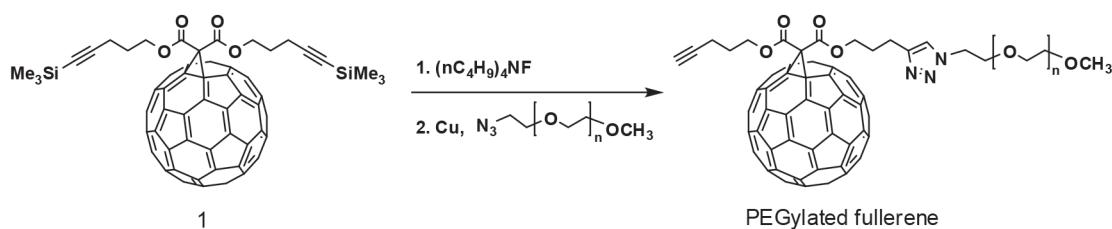
フラレン誘導体の抗酸化作用は既報の方法に従い、評価した<sup>5,6</sup>。まず、フラレン誘導体のメタノール溶液 (0.0023 M) を作製した (A液)。次に、 $\beta$ -カロテンのクロロホルム溶液 (1 g/L) (B液)、リノール酸のクロロホルム溶液 (0.1 g/mL) (C液)、Tween 40 のクロロホルム溶液 (0.2 g/mL) (D液) を調整した。B液 0.25 mL、C液 0.1 mL、D液 0.5 mL をサンプル瓶に量り取り、窒素ガスを噴きつけてクロロホルムを蒸発させた。そこに、超純水 (50 mL)、0.2 M phosphate buffer (4.45 mL) を加え、遮光して 30 分間攪拌した。この溶液を E液 とした。UVセルに E液 2.85 mL と一定量の A液 を加え、50  $^{\circ}\text{C}$  で均一攪拌しながら  $\beta$ -カロテンの吸収 470 nm の時間変化を追跡した。比較試料として A液 と同量の超純水を用いて同様の測定を行った。470 nm 吸収の相対強度は以下の (1) 式に従い、算出した。

$$100 - \left\{ \frac{A_{\text{test at } 0 \text{ min}} - A_{\text{test at } t \text{ min}}}{A_{\text{control at } 0 \text{ min}} - A_{\text{control at } 180 \text{ min}}} \right\} \times 100 \quad (1)$$

### 3. 結果

Bingel 反応を用いて  $\text{C}_{60}$  誘導体 **1** を合成した。**1** のトリメチルシリル基を脱保護した後、銅触媒存在下で 1 当量のメトキシポリエチレングリコールアジドを加えて付加環化反応 (クリック反応) させた (Scheme 1)。カラム精製により未反応原料を取り除き、目的物を単離した。ポリエチレングリコール (PEG) 鎖の分子量によってフラレン誘導体の溶解性に大きな差が現れた。PEG2000 を用いた場合はクロロホルムやトルエンのような有機溶媒に可溶であったがアルコールには不溶であった。一方、PEG5000 を用いた場合はメタノールに可溶となった。本研究では PEG5000 を連結した  $\text{C}_{60}$  誘導体について詳細に述べる。

得られた PEG5000- $\text{C}_{60}$  誘導体は  $^1\text{H NMR}$ 、IR、MALDI-TOF MS より構造を確認した。 $^1\text{H NMR}$  では、PEG 鎖、末端アルキンおよびトリアゾール環のピークが新たに検出された。IR では、末端アルキンの  $\text{C} \equiv \text{C}$  伸縮振動が 2130.0  $\text{cm}^{-1}$  に観測された。さらに MALDI-TOF MS を測定したところ、PEG5000 ではピークトップ分子量 (Mass/Charge) 約 5000 で分子量分布を有するスペクトルが得られたのに対し (Fig. 1 (a))、PEG5000- $\text{C}_{60}$  誘導体ではピークトップ分子量が若干高分子量側にずれるとともに positive mode ではピーク全体がブロード化する様子が見られた (Fig. 1 (b))。これは n 型半導体特性を有する  $\text{C}_{60}$  誘導体の MALDI-TOF MS の特徴であり、確かに目的物が得られたことを示している。



Scheme 1 Synthesis of PEGylated  $\text{C}_{60}$  derivative by CuAAC.

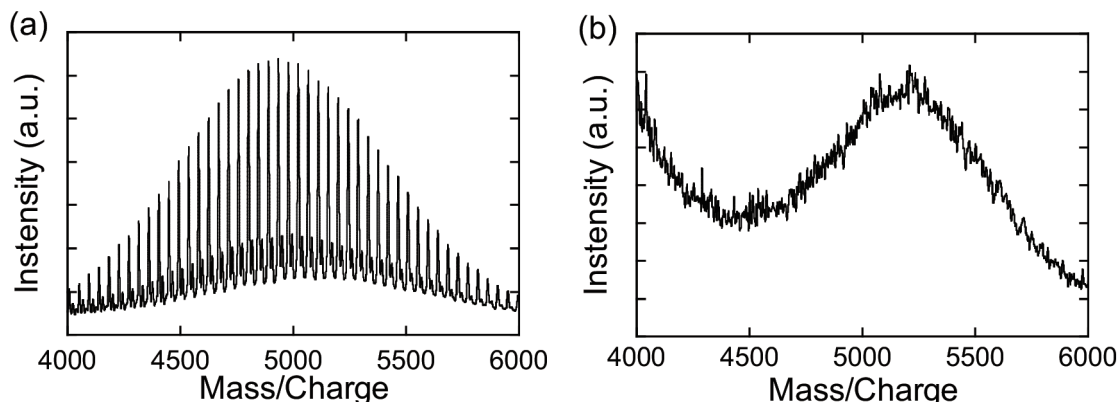


Fig. 1 MALDI-TOF MS spectra of (a) PEG 5000 and (b) PEGylated  $\text{C}_{60}$  (matrix: dithranol).

PEG5000- $C_{60}$  誘導体の抗酸化能を評価した。リノール酸の酸化により生成した過酸化ラジカルが $\beta$ -カロテンを攻撃すると $\beta$ -カロテンの470 nmの吸収強度が減少することが知られている<sup>7,8)</sup>。ここにラジカル補足能がある抗酸化剤を添加しておくことで $\beta$ -カロテンへの攻撃が妨げられる。470 nmの吸収強度変化が抗酸化能と直接関連すると仮定し、評価した。 $C_{60}$  誘導体を添加していない時は $\beta$ -カロテン溶液にリノール酸添加後10分程度で470 nm吸収強度の急激な減少が起きたのに対し、PEG5000- $C_{60}$  誘導体を4.79 mM添加した場合は減少が穏やかになった (Fig. 2)。さらに、PEG5000- $C_{60}$  誘導体の濃度を9.96 mMへ増やすとさらに吸収強度の減少は緩和したことより、PEG5000- $C_{60}$  誘導体に明確な抗酸化作用があることが示唆された。水への溶解性が限られているためこれ以上高濃度での実験ができていないが、既報値と同等の抗酸化能を有していると考えられる。

#### 4. 考 察

アルコールに溶解するPEG5000- $C_{60}$  誘導体を新たに合成し、その抗酸化作用を実証した。完全に水に溶解する $C_{60}$  誘導体を得るにはさらに長いPEG鎖を導入するか、2本のPEG鎖を $C_{60}$  に付加させる必要がある。そうするとさらに高濃度溶液が調整できるため、ラジカル補足能および抗酸化能の向上を実現できるはずである。

今後の予定として、抗酸化作用を既存の抗酸化剤と比較する。また、それによって今回新規に合成したPEG- $C_{60}$  誘導体の抗酸化作用を定量的に評価する。さらに、 $C_{60}$  誘導体によるラジカル補足能を実証するため、スピントラップ試薬を用いてラジカル濃度を定量し、議論する。そのために水溶液用ガラスセル中で電子スピン共鳴 (ESR) によりラジカルを検出する。

また、今回合成したPEG- $C_{60}$  誘導体は未反応の末端アルキル基がもう一つ残っている。分子量5000のPEGを置換することでアルコールへの溶解性が確保できているため、再度CuAAC反応を利用することでアジド化タンパク質へ $C_{60}$  を連結できると考えている。新規なバイオナノ構造体の創製が可能になる道筋を確立する。

#### 5. 総 括

フラレンの $\pi$ 電子系を損なうことなく、水溶性置換基を導入する方法論を確立した。アジド基はフラレンと反応することが知られているが、CuAAC反応の方がはるかに速く進行するため、目的化合物が優先的に得られた

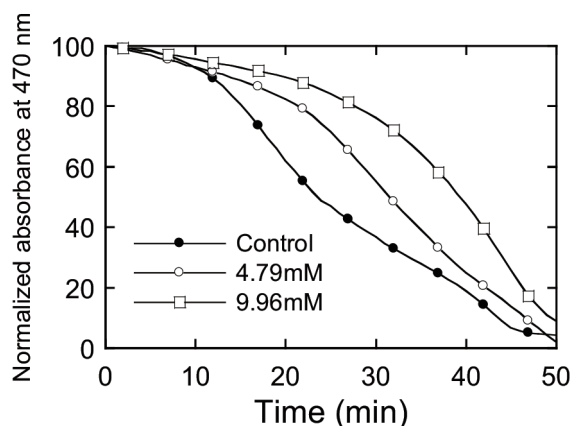


Fig. 2 Time-dependent absorbance change of  $\beta$ -carotene at 470 nm.

ものと考えられる。分子量5000のPEG鎖を導入することでメタノールへ可溶性な $C_{60}$  誘導体とすることができた。完全に水溶性とするにはさらに長いPEG鎖を導入する必要があることが分かった。得られたPEG5000- $C_{60}$  誘導体のメタノール溶液を用いて $C_{60}$  誘導体の抗酸化作用を評価した。PEG5000- $C_{60}$  誘導体を少量(4.79 ~ 9.96 mM)添加すると、リノール酸過酸化ラジカルが $\beta$ -カロテンへの攻撃を抑制することが示された。このことよりPEG5000- $C_{60}$  誘導体には抗酸化作用があることが明らかとなった。

#### (引用文献)

- 1) E. Choe and D. B. Min, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2009**, *8*, 345-358.
- 2) L. Xiao, H. Takada, X. H. Gan, and N. Miwa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1590-1595.
- 3) Y.-G. Ko, S. G. Hahm, K. Murata, Y. Y. Kim, B. J. Ree, S. Song, T. Michinobu, and M. Ree, *Macromolecules* **2014**, *47*, 8154-8163.
- 4) J. Iehl and J.-F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7306-7309.
- 5) S. Kato, H. Aoshima, Y. Saitoh, and H. Miwa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5293-5296.
- 6) M. Horie, A. Fukuhara, Y. Saito, Y. Yoshida, H. Sato, H. Ohi, M. Obata, Y. Mikata, S. Yano, and E. Niki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5902-5904.
- 7) H. Tsuchihashi, M. Kigoshi, M. Iwatsuki, and E. Niki, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *323*, 137-147.
- 8) R. Farhoosh, *Food Chem.* **2005**, *93*, 633-639.