

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05539

研究課題名(和文) 超分子相互作用を利用した金属錯体型アニオン蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Development of Supramolecular Fluorescent Anion Probe Based on Meta Complex

研究代表者

久保 公二 (KUBONO, Koji)

大阪教育大学・教育学部・教授

研究者番号：00269531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：超分子相互作用を利用した金属錯体型アニオン蛍光プローブを開発し、スペクトル測定によりアニオン応答に関する検討を行うとともに高感度な新規アニオン定量法の構築を試みた。水/メタノール混合溶媒中でキノリン系配位子と等量の亜鉛(II)イオンを錯形成させ、これにアニオンを添加したところ、ニリン酸イオンに対して選択的に蛍光強度が減少した。このプローブ溶液についてニリン酸イオンを滴定したところ、0～4 μMの範囲で蛍光強度との間に良好な直線関係が得られた。検出限界は137 nMであった。

研究成果の概要(英文)：Supramolecular fluorescent anion probe based on metal complex with quinoline derivative has been developed and characterized by UV-Vis and fluorescence spectroscopy to research fluorescence response of the probe for anions and to construct a newly high-sensitive determination of target anions. In the addition of diphosphate to the anion probe, Zn(II) complex with quinoline derivative, in a water/methanol solution, fluorescence spectra selectively displayed remarkable decrease of emission intensity. The calibration curve displays a good linear relationship between the fluorescence intensity at 515 nm and the diphosphate concentration (0-4000 nM) with a detection limit of 137 nM.

研究分野：分析化学

キーワード：環境分析 超分子化学 分子認識 蛍光プローブ アニオン定量

### 1. 研究開始当初の背景

リン酸イオンは、河川中における植物プランクトンの制限因子の1つであり、富栄養化による水質悪化を引き起こす要因になり得る。現代においては、人間の活動によって農耕地や都市から排出された硝酸イオンが増加していることから、実質的にリン酸イオンのみが河川中における制限因子となりつつある。しかし、リン酸イオンが制限因子となっている水域で見積もられた溶存態リン酸イオン濃度は  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$  ( $\text{M} = \text{mol dm}^{-3}$ ) を下回るという報告がなされた。ここで、頻繁に用いられているモリブデンブルー吸光度法や、これを改良した方法では著しく感度が不足しており、低濃度のリン酸イオンを正確に測定することが可能な新規定量法の開発が切望されている。また、その他のアニオンについても、微量でも生体に影響を及ぼす場合があることから、高感度検出法の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

配位結合、水素結合、超分子光相互作用を利用した金属錯体型アニオン蛍光プローブの開発を行い、特に環境分析の観点から超微量定量法の構築が望まれているリン酸イオンや、リチウム電池などの産業プロセスでの排出規制がなされている四フッ化ホウ酸イオンなどのアニオンをターゲットとし、それぞれのアニオンに適した超分子相互作用を活用することで高感度な新規定量分析法の構築を行う。なお、プローブにおけるアニオン認識の様式については、配位結合と静電相互作用を併用するイオン対タイプや、配位結合と水素結合を併用にする水素結合タイプについて検討する。これら2つのタイプのアニオンプローブを蛍光分析法に適用し、アニオンの微量定量法を開発する。

### 3. 研究の方法

金属錯体型アニオン蛍光プローブにおける蛍光性部位としてキノリン、サリチルヒドラゾン、カルバゾール、トリフェニルアミンなどを選定し、これらの化合物に配位部位・水素結合部位(超分子相互作用部位)の導入を行った。得られた蛍光性試薬を配位子とする亜鉛(II)などの金属錯体について、溶液の吸収スペクトル並びに蛍光スペクトル測定、電気化学測定、単結晶X線構造解析などを行い、光物性だけでなく錯体の安定性や分子構造の面からもプローブの評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 蛍光性配位子の合成と蛍光プローブ錯体の生成

キノリン誘導体についてはジピコリルアミンを導入した化合物を、サリチルヒドラゾン誘導体については、ジサリチリデンにピペラジンを導入した化合物を合成し、NMR、質量分析法、元素分析、X線構造解析により同

定した。得られたそれぞれの化合物、並びにこれらを配位子とする各種金属イオンとの錯体について、溶液の吸収スペクトル並びに蛍光スペクトル測定を行い、蛍光プローブとしての評価を行った。その結果、キノリン系配位子 **L** については亜鉛(II)錯体の安定性は高いものの、他の金属イオンとも蛍光性の錯体を形成することが確認された。サリチルヒドラゾン系とトリフェニルアミン系配位子については亜鉛(II)イオンと錯形成し、選択的な蛍光応答を示したが、錯体の安定性が低いことが確認された。なお、キノリン系配位子 **L** については、臭化亜鉛(II)と安定な錯体結晶が得られた。カルバゾール誘導体については、ジピコリルアミンの導入を試みたが、目的化合物の合成には至らなかった。そこで、クマリンにピペラジンを導入した化合物を新たに設計・合成し、錯体合成を試みたところ、臭化亜鉛(II)との錯体結晶が得られたが、溶液内での安定性は低かった。

#### (2) 蛍光プローブ錯体の最適条件

キノリン系亜鉛(II)錯体溶液について、水/メタノール混合系における最適混合比、並びに最適pHを検討したところ、pH5.5(MES緩衝液)に調整した水に同体積のメタノールを混合した溶液で、吸収スペクトル並びに蛍光スペクトルにおいて良好な結果が得られた。連続変化法の結果、錯体の組成比は  $\text{Zn}^{2+} : \text{L} = 1 : 1$  であることが確認された(図1)。また、この亜鉛(II)錯体の結合定数は  $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  であった。さらに、滴定実験を行い、蛍光強度における検量線を作成したところ、亜鉛(II)イオン濃度が  $27 \mu\text{M}$  まで定量性がみられた(図2)。しかし、亜鉛(II)イオンが **L** に対して過剰になると蛍光強度の減少が確認された。この現象はpHが高い場合に顕著に見られた。これは、pHが高くなると **L** のOHのプロトンが解離し易くなるが、それに伴い蛍光強度の低い二核錯体が生成するためと考えられる。

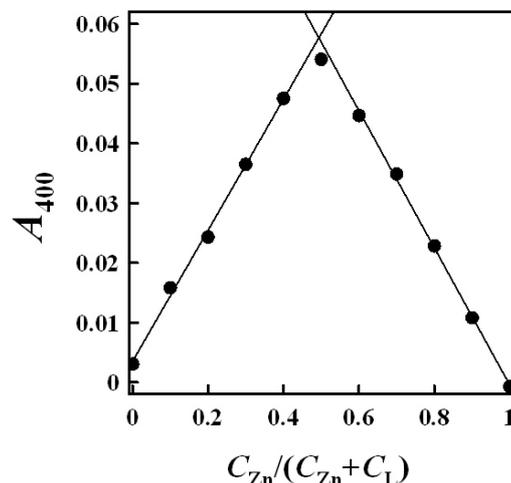


図1 連続変化法

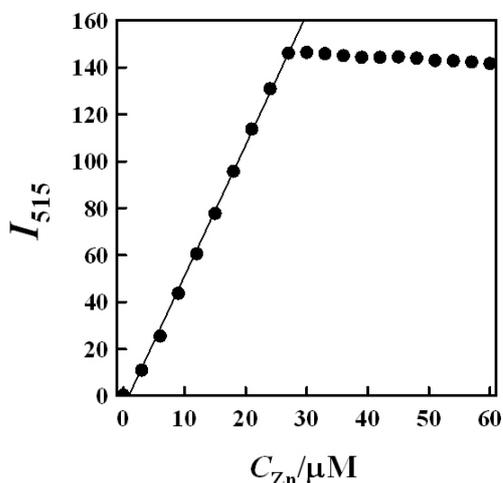


図2 亜鉛(II)の検量線 ( $\lambda_{\text{ex}}=375 \text{ nm}$ )

(3) 蛍光プローブ錯体におけるアニオンとの超分子錯体の生成

溶液内で最も安定性の高いキノリン系亜鉛(II)錯体 ( $[\text{ZnL}]^+$ ) を蛍光プローブとして用いて、この錯体の水/メタノール溶液 (50/50, v/v, pH5.5 MES) に各種アニオンをそれぞれ等量添加し、吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定することで超分子錯体の生成確認を行った (図3および図4)。

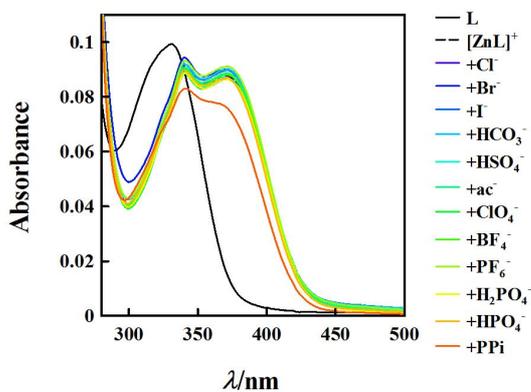


図3 吸収スペクトル

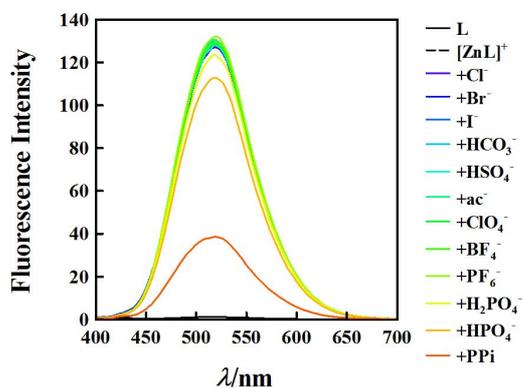


図4 蛍光スペクトル ( $\lambda_{\text{ex}}=375 \text{ nm}$ )

$[\text{ZnL}]^+$  溶液にリン酸水素イオンを添加したところ、蛍光強度の減少は僅かであった。そ

の一方で、二リン酸イオン (PPi) に対しては顕著な強度減少が確認された。また、PPi の添加後の吸収スペクトルは、L のみのそれとは異なることから、このスペクトル変化は亜鉛(II)イオンの解離によるものではないと判断できる。よって、PPi が  $[\text{ZnL}]^+$  に配位結合し、より蛍光強度の低い超分子錯体が生成と考えられる。ここで、この pH 条件では PPi は、プロトンが付加した状態で亜鉛(II)に配位結合していると考えられる。さらに、超分子錯体の生成によって蛍光強度が減少したことから、この PPi の付加プロトンは L の酸素原子と水素結合していることが予想される。

一方、水溶液 (pH7.0 HEPES) においても PPi の添加によって同様の挙動がみられたが、蛍光強度の減少率が水/メタノール溶液の場合に比べて小さく、24 時間以上溶液を放置すると、超分子錯体から PPi が解離することがスペクトル測定により確認された。したがって、水溶液中よりも水/メタノール溶液の方が PPi と  $[\text{ZnL}]^+$  が強く結合しているといえる。さらに、水/メタノール溶液、並びに水溶液における蛍光スペクトルデータを用いて縦軸に蛍光強度比を、横軸に PPi 濃度を取りプロット (Stern-Volmer plot) を行ったところ、共に直線が得られた (図5)。これらの結果から、この超分子錯体の組成は  $[\text{Zn(L)}]^+ : \text{PPi} = 1 : 1$  であり、PPi は消光剤として働いていることが明らかになった。

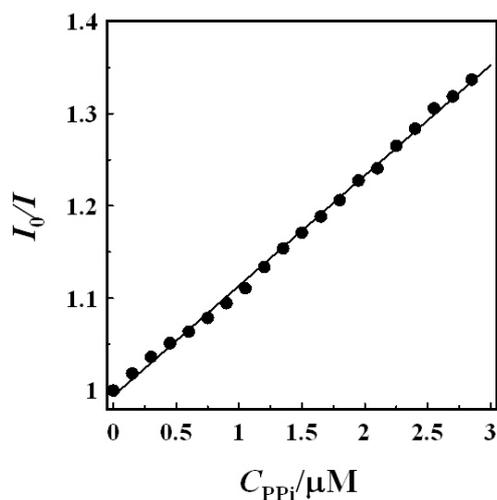


図5 Stern-Volmer plot (水/メタノール溶液)

(4) ニリン酸イオン微量定量法の構築

濃度を  $30 \mu\text{M}$  に調製した  $[\text{ZnL}]^+$  の水/メタノール溶液 (50/50, v/v, pH5.5 MES) に PPi 滴定を行ったところ、PPi の濃度が高くなるにつれて蛍光強度は減少し、 $0 \sim 4 \mu\text{M}$  の範囲で濃度と蛍光強度との間に良好な直線関係が得られた (図6)。この定量法における検出限界は  $137 \text{ nM}$  であった。

水溶液 (pH7.0 HEPES) でも同様に滴定実験を行ったところ、(3) で述べたように蛍光強度の減少率は水/メタノール溶液には及ばないものの、PPi 濃度の増加に伴い蛍光強度

の減少が確認された。この条件での検量線の直線応答範囲は0~3 μMであり,検出限界は199 nMであった。

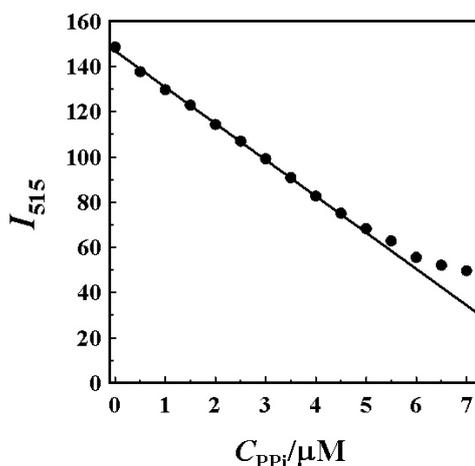


図6 検量線(水/メタノール溶液)

(5) アニオン選択性と蛍光プローブ錯体の評価

蛍光プローブ錯体 $[\text{ZnL}]^+$ におけるアニオン選択性の評価を行うために,各種アニオンを添加した溶液における蛍光強度を比較した。その結果を図7と図8に示す。なお,これらのグラフの縦軸  $I/I_0$  は,  $[\text{ZnL}]^+$ における蛍光強度  $I_0$  と各種アニオンを添加した溶液における蛍光強度  $I$  との比を表す。

水/メタノール溶液ではリン酸水素イオンに対して 12%の蛍光強度の減少が認められたが,それ以外のアニオン添加による強度変化は5%以内であり, PPI に対して選択性が高いことが示された(図7)。なお, PPI 添加による蛍光強度の減少率は約 70%であった。

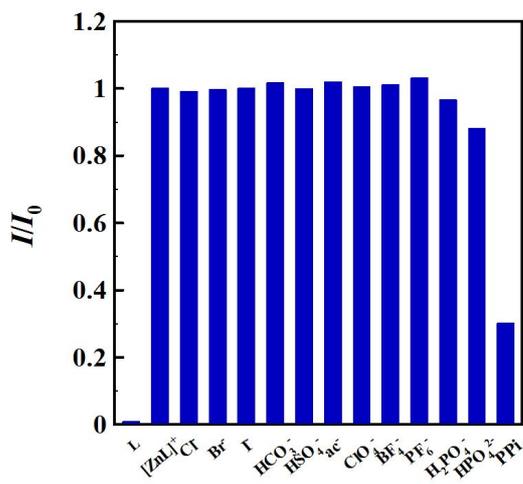


図7 アニオン選択性(水/メタノール溶液)

一方,水溶液では,リン酸水素イオン添加時における蛍光強度の減少率が 8.6%であり,その他のアニオンの添加では 5%以内であることから,水/メタノール溶液に比べて PPI に対する選択性が僅かに高かった。しかしなが

ら, PPI 添加時における強度減少率は 60%であり,水/メタノール溶液のそれよりも低い値であった。(図8)

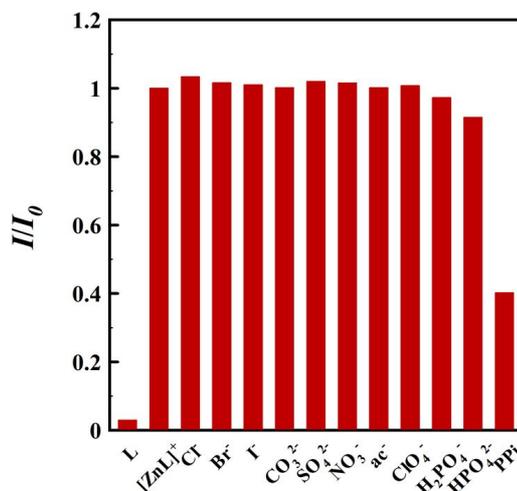


図8 アニオン選択性(水溶液)

以上の結果から,検出化学種である超分子錯体の安定性も考慮すると,蛍光プローブ錯体 $[\text{ZnL}]^+$ における PPI 定量法の最適条件は,水/エタノール(50/50, v/v, pH5.5 MES)溶液であると結論づけられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者,研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Synthesis and Radical Polymerization of Acrylamides Having One or Two 3-Carbazolylmethyl Moieties and Properties of the Formed Polymers

Keita Tani, Haruka Kato, Naoya Sakata, Toru Yashima, Koji Kubono, Kazushige Hori, Keisuke Tao, Kenta Goto, Fumito Tani, Hiroyuki Takemura, Keita Sakakibara, and Yoshinobu Tsujii

*Chemistry Letters*, **46**, 85-87, (2017). 査読有り, DOI:10.1246/cl.160899.

Crystal structure of 7-hydroxy-8-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-2H-chromen-2-one

Koji Kubono, Ryuma Kise, Yukiyasu Kashiwagi, Keita Tani and Kunihiko Yokoi

*Acta Crystallographica*, **E72**, 1751-1753, (2016), 査読有り, DOI: 10.1107/S2056989016017217.

Crystal structure of 7-[[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]-methyl]-5-chloroquinolin-8-ol

Koji Kubono, Kimiko Kado, Yukiyasu Kashiwagi, Keita Tani and Kunihiko Yokoi

*Acta Crystallographica*, **E71**, 1545-1547, (2015). 査読有り, DOI: 10.1107/S2056989015022410.

〔学会発表〕(計 10 件)

キノリノラト亜鉛(II)錯体型蛍光プローブのアニオン認識機能, 久保埜 公二, 門 貴美子, 柏木 行康, 谷 敬太, 横井邦彦, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年.

水溶性キノリノラト亜鉛(II)錯体を蛍光プローブとするピロリン酸イオン定量法, 久保埜 公二, 堀 聡志, 門 貴美子, 柏木 行康, 谷 敬太, 横井 邦彦, 日本分析化学会第 66 年会, 2017 年.

クマリン系亜鉛(II)錯体をプローブとするアニオンセンサーの開発, 久保埜 公二, 黄瀬 隆磨, 柏木 行康, 谷 敬太, 横井 邦彦, 第 77 回分析化学討論会, 2017 年.

トリフェニルアミン型蛍光プローブのリン酸認識機能, 日野 隼輔, 久保埜 公二, 柏木 行康, 横井 邦彦, 日本化学会第 97 春季年会, 2017 年.

ピペラジンを有するクマリン型金属イオンセンサーの蛍光特性, 久保埜 公二, 黄瀬 隆磨, 柏木 行康, 谷 敬太, 横井 邦彦, 日本化学会第 97 春季年会, 2017 年.

キノリノール系亜鉛(II)錯体型蛍光アニオンセンサーの開発, 久保埜 公二, 門 貴美子, 柏木 行康, 谷 敬太, 横井 邦彦, 日本分析化学会第 65 年会, 2016 年.

トリフェニルアミン型蛍光プローブを用いたリン酸二水素イオン定量法の構築, 日野 隼輔, 久保埜 公二, 柏木 行康, 横井 邦彦, 日本分析化学会第 65 年会, 2016 年.

ジサリチリデン型蛍光アニオンセンサーの設計と錯形成反応, 久保埜 公二, 石原 万里奈, 谷 敬太, 横井 邦彦, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年.

トリフェニルアミン系蛍光プローブのアニオンセンシング機構, 久保埜 公二, 野口 結加, 辻本 純一, 横井 邦彦, 柏木 行康, 2015 年日本イオン交換学会・日本溶媒抽出学会連合年会, 2015 年.

サリチルアルデヒドアジン型蛍光プローブの開発, 久保埜 公二, 石原 万里奈, 谷 敬太, 横井 邦彦, 日本分析化学会第 64 年会, 2015 年.

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保埜 公二 (KUBONO Koji)  
大阪教育大学・教育学部・教授  
研究者番号: 00269531

(2)研究分担者

横井 邦彦 (YOKOI Kunihiko)  
大阪教育大学・教育学部・教授  
研究者番号: 310144554

谷 敬太 (TANI Keita)  
大阪教育大学・教育学部・教授  
研究者番号: 60207165

(3)連携研究者

柏木 行康 (KASHIWAGI Yukiyasu)  
地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・研究主任  
研究者番号: 30416333