

平成30年9月28日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06556

研究課題名(和文) フォトクロミック分子を基盤とする有害物質の高感度オプティカルセンシング

研究課題名(英文) Highly-Sensitive Optical Sensing for Hazardous Ions Based on Photochromic Molecules

研究代表者

白石 康浩 (SHIRAIISHI, YASUHIRO)

大阪大学・太陽エネルギー化学研究センター・准教授

研究者番号：70343259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水中に含まれる有害なシアン化物イオン(CN-)を迅速かつ正確に定量するための分子センサーの開発に取り組んだ。CN-と選択的に反応する新たなレセプターサイトを導入した新規分子の開発により、高い選択性、迅速な応答、高感度な応答、の三つの特長を有する分子センサーの開発に取り組んだ。特に、イミンをレセプターサイトとして利用する新たな分子設計により、これまで困難であった中性pHでのCN-センシングが実現できることを見出し、新たなセンサー設計が可能となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have designed new molecular sensors for rapid and accurate quantification of hazardous cyanide anion (CN-) in water. Our strategy involves the creation of new sensors by introducing new receptor sites that selectively react with CN- for rapid, selective, and sensitive quantification of CN-. In particular, we designed a sensor containing imine as a new receptor site, which facilitates rapid and selective reaction with CN- even in water with neutral pH. The results may contribute to the future design of new sensors for CN- detection.

研究分野：光化学・光触媒化学

キーワード：分子センサー 有害物質 オプティカルセンシング シアン化物イオン 吸収 蛍光 次亜塩素酸イオン

1. 研究開始当初の背景

水中には様々なイオン種が含まれている。なかでも CN^- は、低濃度でも人体に極めて有害であり、精度の高い定量法が不可欠である。通常 CN^- は、高速液体クロマトグラフによる測定が可能であるが、煩雑な前処理操作を必要とするうえ、検出感度が低く、正確な定量は困難である。それゆえ、汎用の分析機器によりこれらの有害イオン種を正確かつ簡便に定量する方法の開発は喫緊の課題である。

これらの課題を解決する方法として注目を集めているのが、分子センサーである。これらの分子は、特定の物質と選択的に相互作用することにより、吸収あるいは蛍光スペクトルを変化させる。そのため、低濃度の物質でもスペクトル測定により正確に定量することが可能である。ここ数年、イオン種の分析に対しては多くの分子センサーが開発されている。しかしながら、これらの多くは有機溶媒中で機能するものであり、水中の有害イオン種を検出できる分子センサーはほとんどない。また、これまでに開発された分子センサーは、(1) 特定のイオン種に対する選択性が低い、(2) 応答速度が遅い、(3) 感度が低い、などの問題があり、環境中の微量有害イオン種を正確かつ迅速に定量できる分子センサーは数例しか報告されていない。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、ローダミンやフルオレセインをはじめとする色素分子の誘導体化により、水中に含まれるイオン種を選択的に定量するための分子センサーを開発してきた (例えば、*Chem. Commun.* **49**, 11680 (2013); *Chem. Commun.* **49**, 3434 (2013))。これらの研究の中で、 CN^- の求核性を利用する新たなセンサー設計が可能となることを見出している。例えば、スピロピランなどのフォトクロミック分子では、求電子的なスピロ炭素へ CN^- が選択的に求核付加することにより、吸収あるいは蛍光特性が著しく変化することを見出している。

本研究では、水中に含まれる有害な CN^- を迅速かつ正確に定量するための分子センサーを開発する。 CN^- と選択的に反応する新たなレセプターサイトを導入した新規分子の開発により、高い選択性、迅速な応答、高感度な応答、の三つの特長を有する分子センサーの開発に取り組む。

3. 研究の方法

平成 27 年度は、 CN^- の高感度検出のため、(1) インドリウム-クマリン複合体、(2) ピリリウム-クマリン複合体、(3) インダンジオン-クマリン複合体の三種の CN^- センサーを開発した。(1) インドリウム-クマリン複合体においては、求電子的な高いインドリウム炭素に対して CN^- が付加することにより蛍光発光を出現させるメカニズムにより、 $0.5 \mu\text{M}$ の低濃度のシアン検出が可能になることを

明らかにした。また、(2) ピリリウム-クマリン複合体においては、 CN^- の付加によるピリリウム環の開裂により吸収波長がブルーシフトし、吸収スペクトル分析によりシアン検出が可能であることを見出した。さらに、(3) インダンジオン-クマリン複合体においては、二つのカルボニル炭素により活性化されたオレフィン炭素に対して CN^- が付加する新たなメカニズムにより蛍光 CN^- 検出が可能であることを明らかにした。

平成 28 年度は、(4) クマリン-スピロピラン水素化複合体、(5) クマリン-キノキサリン複合体の二種の CN^- センサーを開発した。(4) クマリン-スピロピラン水素化複合体においては、求電子的な高いスピロ炭素に対してシアンが付加することにより開環構造を形成し、蛍光発光を出現させるメカニズムにより、 $0.5 \mu\text{M}$ の低濃度の CN^- 検出が可能になることを明らかにした。また、(5) クマリン-キノキサリン複合体においては、両者を CN^- との反応性の高いイミンで結合させた。イミン部位は、 HCN とのストレッカー反応による二重結合の消失により、両者間での電荷移動を抑制する。そのためクマリン由来の強い蛍光が出現する。本方法では、これまで困難であった中性 pH でのシアン検出が可能になり、生体応用が可能になる新たな分子設計指針を見出した。

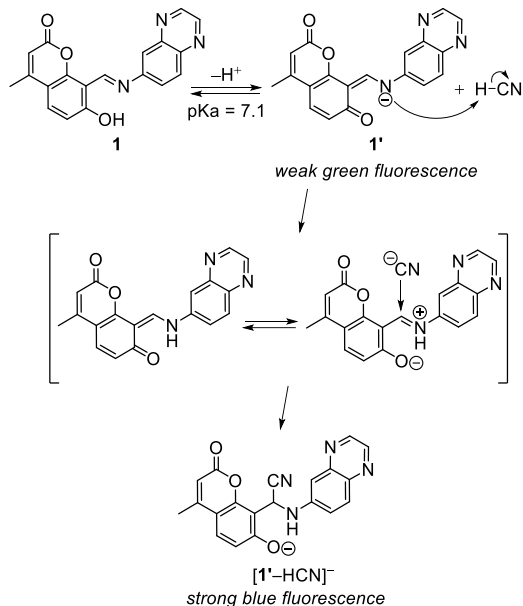
平成 29 年度は、 CN^- 検出のため、(6) クマリン-ナフタルイミド複合体を開発した。本分子は、 CN^- が存在しない場合には 533 nm の長波長蛍光を示すが、 CN^- 存在下では新たに 444 nm の短波長蛍光を示す。この際、長波長蛍光の強度は変化しないため、両蛍光の強度比に基づいて CN^- 濃度を決定するセルフキャリブレーションが可能であることを見出した。そのため、細胞内のシアン濃度を蛍光顕微鏡観察により求める新たな分析方法の確立を可能とした。また、 ClO^- イオンの検出に関する研究を進め、汎用のマラリア治療薬として用いられる (7) タフェノキン分子が ClO^- と反応することにより蛍光発光を示すセンサー分子となることを新たに見出した。本方法により、細胞内 ClO^- の顕微鏡観察が可能となることを明らかにした。

4. 研究成果

本研究報告においては、上述 (6) のクマリン-ナフタルイミド複合体による CN^- 検出について詳述する。

CN^- 検出に対しては、これまで多くのセンサー分子が開発されているものの、これらの多くは中性 pH での CN^- 検出が困難である。これは、中性 pH において CN^- がプロトン化されることにより ($\text{H}^+ + \text{CN}^- \leftrightarrow \text{HCN}$, $\text{pK}_a 9.2$)、その求核性が失われてしまうためである。我々は、Scheme 1 に示すように、クマリン-イミン-キノキサリンからなる簡単な構造を有する連結分子 **1** を開発した。本分子は、中性 pH でのイミン部位と HCN とのストレッ

カー反応によりクマリン上の π 電子が局在化し、強い青色蛍光を示すことを見出した。本分子は、迅速 (3 min)、選択的、かつ高感度 (検出限界 1.4 μ M) な CN^- 検出が可能であることを明らかにした。



Scheme 1. Reaction mechanism

Fig. 1 には、水/アセトニトリルからなる混合溶液中 (7/3 v/v; HEPES 100 mM, pH 7.0, 25 °C) で測定した分子 **1** の蛍光スペクトルを示している。分子 **1** は弱い緑色蛍光 (蛍光量子収率 $\Phi_F = 0.02$) を示すが、 CN^- を添加した場合には、443 nm に強い青色蛍光 ($\Phi_F = 0.31$) を示す。一方、他のアニオンや求核試薬を添加した場合には蛍光スペクトルは変化しない。さらに、これらの夾雑物を CN^- とともに加えた場合にも蛍光の増加は抑制されず、分子 **1** は高選択的な CN^- 検出が可能であることが分かった。

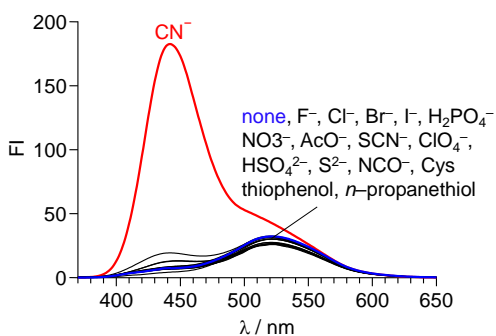


Fig. 1 Fluorescence spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm) of **1** with 50 equiv of each respective nucleophiles in a buffered water/MeCN mixture (7/3 v/v; HEPES 100 mM, pH 7.0) at 25 °C.

このような分子 **1** の CN^- に対する特異的な発光応答を MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR スペクトル測定から明らかにした。Scheme 1 に示すように、分子 **1** を中性溶液中に溶解させると、

$-\text{OH}$ 基の脱プロトン化が起こる (**1'**種の生成)。この **1'**種に HCN が付加する、いわゆるストレッカー反応により、 $[\mathbf{1}'\text{-HCN}]^-$ 種が生成することが分かった。Fig. 2 に示すように、 ^1H NMR 測定の結果、**1'**種への HCN の付加により $[\mathbf{1}'\text{-HCN}]^-$ 種が生成することが確認された。

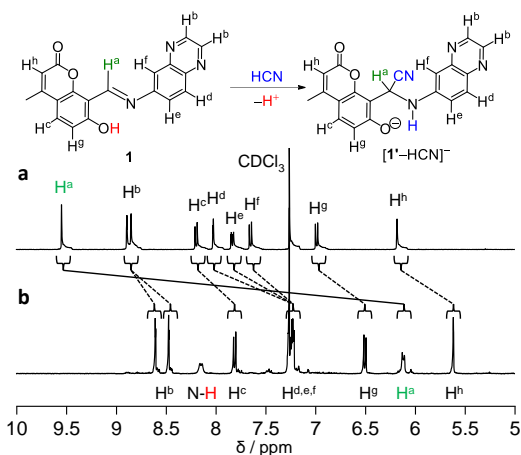


Fig. 2 ^1H NMR charts (400 MHz, 30 °C, CDCl_3) of (a) **1** (5 mM) and (b) the product obtained by the reaction of **1** with 1 equiv of CN^- in a buffered water/MeCN mixture (7/3 v/v; HEPES 0.1 M, pH 7.0) at 25 °C.

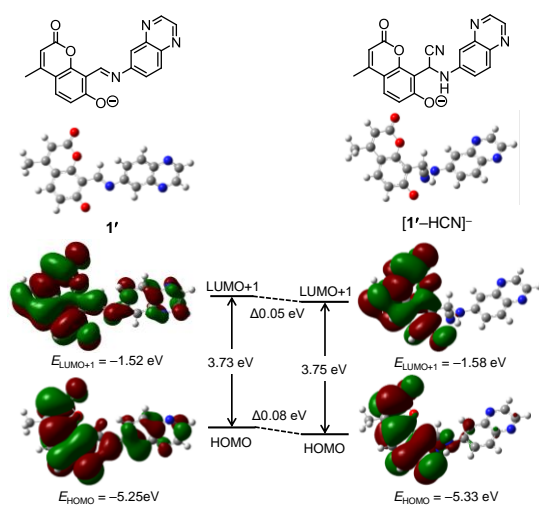


Fig. 3 Energy diagrams and electron distribution for main molecular orbitals of (left) **1'** and (right) $[\mathbf{1}'\text{-HCN}]^-$ species, calculated at the DFT level (B3LYP/6-31+G(D)) using PCM with MeCN as a solvent.

これらの種の発光挙動の変化を Ab initio 計算により考察した。Fig. 3 (left) に示すように、**1'**種の HOMO および LUMO+1 上の電子は分子全体に非局在化していることが分かる。したがって **1'**種は、光励起したクマリン部位からキノキサリン部位への分子内電荷移動 (ICT) により消光し、蛍光をほとんど発光しない。一方、Fig. 3 (right) に示すように、 $[\mathbf{1}'\text{-HCN}]^-$ 種の HOMO および LUMO+1 上の電子はクマリン上に局在化していること

が分かる。したがって、1'上のイミン部位へ HCN が付加することにより ICT が抑制され、 π 電子がクマリン上に局在化することを示している。この π 電子の局在化がクマリンからの強い青色蛍光を出現させる要因となっていることが分かった。

CN⁻を添加した場合の分子 **1** の蛍光スペクトルの時間変化を測定したところ、蛍光増加は約 3 min で終了した。したがって、これまでに報告された分子センサーを上回る極めて迅速な CN⁻検出が可能である。また、CN⁻濃度に対して 443 nm の蛍光強度をプロットすると、0-500 μ M の範囲で良好な直線関係が見られた ($R^2 = 0.9986$)。したがって、**1** はこの濃度範囲で正確な CN⁻の定量が可能であることが分かる。なお、検出限界は 1.4 μ M であり、極めて高感度な CN⁻検出が可能である。イミン部位を反応部位として用いる分子設計により、これまで困難であった中性 pH における CN⁻の蛍光検出が可能になった。

まとめ

水中に含まれる CN⁻を迅速かつ正確に定量するための分子センサーの開発に取り組んだ。CN⁻と選択的に反応する新たなレセプターサイトを導入した新規分子の開発により、高い選択性、迅速な応答、高感度な応答、の三つの特長を有する分子センサーの開発が可能であることを示した。特にイミンをレセプターとして用いる新規分子設計により、これまで困難であった中性 pH での CN⁻が可能であることを見出し、新たなセンサー設計指針を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Yasuhiro Shiraishi, Masaya Nakamura, Takayuki Hirai, "Effects of Substituents on Fluorometric Detection of Cyanide Anions by Indolium-Coumarin Dyads," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**(38), 25027-25036 (2015); DOI: 10.1039/C5CP03877D, 査読有
2. Yasuhiro Shiraishi, Masaya Nakamura, Naoyuki Matsushita, Takayuki Hirai, "Pyrilium-Coumarin Dyad as a Colorimetric Receptor for Ratiometric Detection of Cyanide Anion by Two Absorption Bands in Visible Region," *New J. Chem.*, **40**(1), 195-201 (2016); DOI: 10.1039/C5NJ02219C, 査読有
3. Yasuhiro Shiraishi, Masaya Nakamura, Tetsuri Kogure, Takayuki Hirai, "Off-on Fluorometric Detection of Cyanide Anion in an Aqueous Mixture by an Indane-Based Receptor," *New J. Chem.*, **40**(2), 1237-1243 (2016); DOI: 10.1039/C5NJ02873F, 査読有
4. Yasuhiro Shiraishi, Masaya Nakamura, Naoto Hayashi, Takayuki Hirai, "Coumarin-Spyropropan Dyad with a Hydrogenated Pyran Moiety for Rapid, Selective, and Sensitive Fluorometric Detection of Cyanide Anion," *Anal. Chem.*, **88**(13), 6805-6811 (2016); DOI: 10.1021/acs.analchem.6b01279, 査読有
5. Yasuhiro Shiraishi, Naoto Hayashi, Masaya

Nakamura, Takayuki Hirai, "Coumarin-Imine-Quinoxaline Linkage Designed Based on the Strecker Reaction as a Receptor for Fluorometric Cyanide Anion Detection in Neutral Media," *Chem. Lett.*, **45**(11), 1294-1296 (2016); DOI: 10.1246/cl.160695, 査読有

6. Avijit Kumar Das, Naoto Hayashi, Yasuhiro Shiraishi, Takayuki Hirai, "An Antimalarial Drug, Tafenoquine, as a Fluorescent Receptor for Ratiometric Detection of Hypochlorite," *RSC Advances*, **7**(48), 30453-30458 (2017); DOI: 10.1039/c7ra04867j, 査読有
7. Yasuhiro Shiraishi, Naoto Hayashi, Masaki Nakahata, Shinji Sakai, Takayuki Hirai, "Naphthalimide-Coumarin Conjugate: Ratiometric Fluorescent Receptor for Self-Calibrating Quantification of Cyanide Anion in Cells," *RSC Advances*, **7**(51), 32304-32309 (2017); DOI: 10.1039/c7ra05423h, 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Masaya Nakamura, Yasuhiro Shiraishi, Takayuki Hirai, "インドリウム-クマリン複合体によるシアン化物イオンの蛍光センシング," 2015 年光化学討論会, 2015 年 9 月 9 日、大阪市立大学杉本キャンパス、査読無
2. Masaya Nakamura, Yasuhiro Shiraishi, Takayuki Hirai, "ピリリウム-クマリン複合体によるシアン化物イオンの比色センシング," 第 96 回日本化学会春季年会, 2016 年 3 月 26 日、同志社大学京田辺キャンパス、査読無
3. Naoto Hayashi, Yasuhiro Shiraishi, Takayuki Hirai, "ストレッカーレセプターによるシアン化物イオンの高感度蛍光センシング," 2016 年光化学討論会, 2016 年 9 月 6 日、東京大学駒場キャンパス、査読無
4. Naoto Hayashi, Yasuhiro Shiraishi, Takayuki Hirai, "ストレッカーレセプターによるシアン化物イオンの高感度蛍光センシング," 第 97 回日本化学会春季年会, 2017 年 3 月 17 日、慶応義塾大学日吉キャンパス、査読無

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/hirai/lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 康浩 (SHIRAIISHI YASUHIRO)

大阪大学・太陽エネルギー化学研究センター・准教授

研究者番号：70343259

(2) 研究分担者

平井 隆之 (HIRAI TAKAYUKI)

大阪大学・太陽エネルギー化学研究センター・教授

研究者番号：80208800