

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号： 12701

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2009 ~ 2011

課題番号： 21605006

研究課題名（和文） 粘土を主成分とする機能性分子を担持したハイブリッド膜の分子設計と作製

研究課題名（英文） Molecular design and preparation of hybrid clay sheets in which organic functional molecules are intercalated between clay layers.

研究代表者 榊原 和久 (SAKAKIBARA KAZUHISA)

横浜国立大学・工学研究院・教授

研究者番号： 80114966

研究成果の概要（和文）：粘土（モンモリロナイト）の層間に、活性ラジカル種を捕獲し、安定な付加体（ラジカル付加物）を形成する能力を持つ機能性有機分子（ラジカル捕獲剤）を担持させたハイブリッド膜を作製し、実験室系及び実環境中に存在するラジカル化学種の捕獲とスペクトル分析による確実な同定を行える分析法を確立した。本方法を用いれば、環境中に存在する人体に悪影響を及ぼす環境微粒子の捕獲・定量や同定等、広範囲にわたる環境分析を効果的に実施することが可能である。

研究成果の概要（英文）：By intercalating organic functional materials such as radical capturing reagents which enable to trap short-lived reactive radicals as stable adducts between the clay layers of Montmorillonites, new hybrid-clay sheets have been prepared. Thus prepared hybrid-sheets were used in order to capture the reactive radical species generated in vitro experiments or actual environments, and to quantify existing radicals in addition to the characterization of radical species. Applying this new analytical method, environmental analysis to monitor the amount of hazardous toxic radicals and to identify effectively may be successfully carried out.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：元素戦略

キーワード：ケイ素、環境中のラジカル捕獲、粘土膜

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 自動車の排気ガス中のナノ粒子は、生体毒性が強く、癌や喘息を引き起こす原因となることが国立環境研での研究により明らかになっていたが、健康を害する直接的な要因となる化学物質の性状、構造についての科学的なデータが無かった。

(2) 本研究の予備実験として、交通量の多い

道路沿いに設置した排気ガス集塵装置で採取したナノ粒子で、特に強い生体毒性を示したものについて ESR 測定を行い、ラジカル成分が存在することを確認し、生体毒性の発現にはラジカル化学種が深く関わっていることが明らかになっていた。しかし、生体毒性が強く、高いラジカル濃度を示した粒子は、時間と共にラジカル濃度が減少し、ラジカル

化学種の変性や解裂（崩壊）などがかなりの速さで進行することが明らかになった。環境中に存在した生体毒性の高いラジカル種を、さらに安定化した状態で分析することが必要である。

(3) 自動車排ガス中の生体毒性の高いナノ粒子を、液体クロマトグラフ(LC)や、ガスクロマトグラフ-質量分析装置(GC/Mass)で分析した実験は報告されていたが、多種多様の化学種が存在していることを示す実験結果が示されているだけで、生体毒性が高いことが考えられるラジカル化学種のピークを特定し、それらの性状解析、物質の同定を行っている報告はなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 環境中に存在する人間の健康に悪影響を及ぼすと考えられるラジカル化学種を効率的に捕獲する機能を持つと考えられる“ラジカル捕獲剤”を粘土膜中に担持させたラジカル捕集粘土膜を調製し、環境中に存在する環境ナノ粒子の性状解析に応用できるようにする。

(2) 作製したラジカル捕集粘土膜を用いて、実験室系で発生させたラジカルの捕獲実験を行い、どのようなラジカル捕獲剤が環境中のラジカル化学種の捕獲に相当であるか指針を策定する。また、どの程度の濃度の活性ラジカルの捕獲定量が可能であるか定量分析が可能な濃度限界を明確にする。

(3) ラジカル捕獲剤によって捕獲した短寿命活性ラジカル種の同定法を確立する。ラジカル化学種の定量は、ESR スペクトル測定によって簡単にを行うことができるが、環境ナノ粒子中にどのようなラジカルが存在しているかを明らかにするための分析法を確立しておく必要がある。質量分析法(Mass スペクトル)は、有用で便利な手段であるが、ラジカル捕獲剤と短寿命活性ラジカルが反応して生成したラジカル付加物の安定性がそれほど高くないので、相応しいソフトイオン化法を応用して分析する必要がある。

(4) ラジカル濃度の正確な定量実験法の確立。ESR法は確かに便利な分析法ではあるが、他の相補的な定量分析法も確立しておけば、環境中のラジカル種の濃度を、より確実に正確に評価することができる。検出感度の事を考慮すると蛍光分析は、有用なものと考えられるので、ラジカル捕獲剤に蛍光発光能力を持った官能基を付与することで対応したいと考えている。

(5) 開発した分析法を応用して、実際の環境下でのラジカル捕獲および定量実験の実施。開発したラジカル捕集粘土膜を用いた短寿命活性ラジカル種の捕獲・定量、性状解析がどの程度有用であるかを、実際の環境下でのラジカル捕集実験を行うことで確認したい。

幸いにも、国立環境研究所に設置された「ナノ粒子健康影響実験棟」のディーゼル排ガス反応用チャンバーの利用が可能であるので、実際の環境とほぼ同じ条件でのラジカル種の捕獲分析が可能であると考えている。

## 3. 研究の方法

(1) 短寿命活性ラジカル種を捕獲する“ラジカル捕獲剤”は、ラジカルスカベンジャーと呼ばれる常温で安定なラジカル(ニトロキシルラジカル or DPPH:2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)や、活性ラジカル種をニトロ基に付加させて安定ニトロキシル化合物とするスピントラップ剤を使用する。これらのラジカル捕獲剤を、粘土(モンモリロナイト)粉末と共に溶媒中に分散させ、十分に攪拌した後、キャスト法によりラジカル捕集粘土膜を調製した。実験室系で発生させた短寿命活性ラジカル種と反応させたラジカル捕集粘土膜は、ESRスペクトル測定を行い、ラジカル種の二重積分値から捕獲したラジカル種の濃度を見積もることができる。また、ラジカル捕獲剤として、蛍光発光部位を持つ安定ニトロキシル分子を用いてラジカル捕獲を行えば、蛍光強度の増大からラジカル種の濃度を評価することも可能である。

(2) 短寿命活性ラジカル種の実験室での発生は、Fenton反応(過酸化水素 $H_2O_2$ と $Fe^{2+}$ の反応)、過酸化物の分解、アゾ化合物の熱or光分解を利用して行った。活性ラジカル種と反応させたラジカル捕集粘土膜は、そのままESR測定管に入れてESR二重積分強度を測定することで、簡便にラジカル濃度の定量を行った。ラジカル種の濃度評価の定量性の精度を高めるためには、調製したラジカル捕集粘土膜を、細かな粒子状にして捕獲実験を行った。

(3) ラジカル捕獲剤によって捕まえた短寿命活性ラジカル種の同定法としては、Massスペクトル分析が現状では最も適切と考えられる。ただし、スピン付加物の安定性がそれほど高くないので、ソフトなイオン化を行って測定対象となるラジカルの分子イオンピークがきちんと検出されて、フラグメントイオンのピークが殆ど出現しないことが望ましい。上記の要求に合致するソフトイオン化法としては、(a) IA (Ion Attached) - イオン化法と(b) LDI (Laser Desorption Ionization) が優れていると考えられるので、両者のソフトイオン化法を用いてMassスペクトル測定を行った。また、Massスペクトル測定の際には、ラジカル捕集粘土膜のままの状態で行うことができるが、迅速な方法であり、望ましいことであるので、どのようなやり方でMassスペクトル測定を行えば、S/N比の良い測定結果が得られるか、種々検討を行った。

(4) ラジカル濃度の正確な定量には ESR 法が最も簡便で直接的であるが、ESR キャビティ内のマイクロ波パワーが最も強い場所に試料をきちんと挿入することが必須である。ラジカル捕集粘土膜のまま ESR 測定管に入れてスペクトル測定を行う場合、十分に密な状態で粘土膜を詰める作業には、かなりの任意性が測定者によって生ずる場合があり、その為に ESR シグナル強度が変化する事が考えられる。したがって、特にラジカル濃度の定量に意を配る必要がある時には、ラジカル捕集粘土膜のある決まった粒径 (53~100 μm) サイズにして、ESR サンプル管に詰める作業を行った。ESR スペクトル測定以外の分析法でもラジカル濃度の定量は可能であり、本研究では蛍光スペクトル分析による測定も行った。ラジカル捕獲剤中にアントラセン環のような多環式芳香族環構造を導入しておくことで蛍光発光能力が付与されるが、蛍光発光基を有する安定ニトロキシルラジカル (ラジカル捕獲剤) は、分子中にエネルギーの高いニトロキシルラジカルの軌道を持つため、蛍光発光に関する励起-重項の消光プロセスが速やかに起こり、蛍光発光が抑制される。しかし、ラジカル捕獲剤が活性ラジカルを捕獲すると、エネルギーの高いラジカルの軌道が無くなるので蛍光発光の強度が増大することとなり、ラジカル捕獲量に応じて蛍光強度が一次関数的に増大するので、蛍光強度測定からも定量評価ができ、ESR 測定と蛍光強度測定を相補的に利用することで、活性ラジカル種のより正確な定量を行うことができる。

(5) ラジカル捕集粘土膜を用いた実際の環境下でのラジカル捕集実験は、国立環境研での実験用チャンバーを利用させていただき、ディーゼル排ガス中のラジカル成分の捕獲・定量および同定実験を行うことを考えている。また、近年、ディーゼル排ガスに含まれる環境ナノ粒子に、揮発性有機物質やオゾンなどの活性酸素化学種が作用して生成する二次生成有機エアロゾル (SOA: Secondary Organic Aerosol) の生体毒性への関心が高まっていることから、二次生成有機エアロゾル中のラジカル化学種の分析も行うことも考えている。

#### 4. 研究成果

(1) 粘土層間に担持させるラジカル捕獲剤としては、図 1 に示す安定ラジカル種 (A): 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)、(B): 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-3-oxide-1-oxyl (PTIO)、(C): 4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (4-oxo-TEMPO)、スピントラップ剤 (D): -phenyl N-tert-butyl nitron (PBN) として、蛍光発色基を分子内に有する安定ニトロキ

シルラジカル (E): tert-butyl (10-phenyl-9-anthryl) nitroxyl (Ph-ATBN) を使用した。

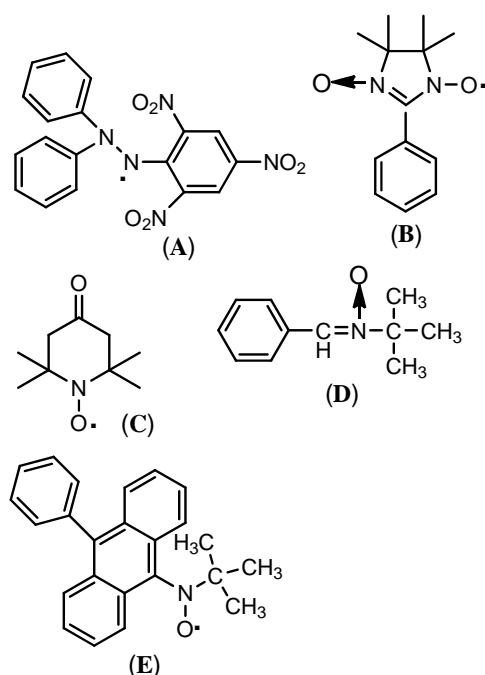


図 1. 粘土層間に担持させたラジカル捕獲剤の構造

これらスピントラップ剤は適当な溶媒中にモンモリロナイト粘土と共に分散させ、十分に攪拌した後、キャスト法によりラジカル捕集粘土膜とした。安定ニトロニル-ニトロキシルラジカル PTIO(B)は、水への溶解度が高いため水溶液中に分散させることで粘土膜の調製が可能であったが、他のラジカル捕獲剤は有機溶媒にしか溶けないので、有機四級アンモニウム塩化合物を共存させることで、粘土層間に親油性のラジカル捕獲剤を担持させ、ラジカル捕集粘土膜とした。

このように調製したラジカル捕集粘土膜を、実験室系で発生させた短寿命活性ラジカルと反応させ、ESR スペクトルを行うことで、活性ラジカルの捕獲性能を評価した。実験結果より、ニトロニル化合物は活性ラジカル種の捕獲により安定ニトロキシルラジカルが生成するので、ESR スペクトルによりその存在を容易に確認できるものの、ラジカルスカベンジャーとして働く安定ラジカル種 (A)、(B)、(C)、(E) として比較して活性ラジカル捕獲能が 10 分の 1 以下に減少してしまうことが分かった。捕獲したい短寿命活性ラジカル種の環境中での濃度を考慮した上で、使用するラジカル捕獲剤の種類を適宜選ぶ必要がある。また、ラジカル捕獲剤が短寿命活性ラジカル種を捕獲して生成する“ラジカル付加物”の中でも、 $\cdot\text{OH}$  ラジカルに代表される活性酸素ラジカル種を捕獲したラジカル

付加物の安定性は極めて低いことが分かった。特に、 $\cdot\text{OH}$  ラジカルの場合、その寿命は数秒～数分と非常に短く、スペクトル分析などでその構造確認を行うためには、われわれが新規考案したラジカル捕集粘土膜を用いることが必須である粘土層間に担持されたラジカル付加物の安定性は、単純にラジカル付加物を常温下に放置したものと格段に向上し、 $\cdot\text{OH}$  ラジカルの付加物でも1ヶ月～数ヶ月の間変質・崩壊することなく存在する。このラジカル捕集粘土膜の優れた特性は、環境中の活性ラジカル種の捕獲、定量、同定の分析に大いに役立つものと考えられる。

(2) 図1に示したラジカル捕獲剤を用いて、アルキルラジカル(メチル、エチル、isoプロピル、tert-ブチル)、アリール(フェニル、ナフチル)、 $\cdot\text{OH}$  ラジカル、ヒドロキシルメチルラジカル、2-シアノ-2-プロピルラジカル、 $\text{Cl}\cdot$  ラジカル等の活性短寿命ラジカル種の捕獲実験を行った。炭素中心ラジカルは、図1に示したラジカル捕獲剤と良く反応してラジカル付加物を生成するが、活性ラジカルの構造が高高いものとなると、ラジカルスカベンジャー((A)、(B)、(C)、(E))を用いたラジカル付加物中の  $\text{NO}-\text{C}$  (活性ラジカルの炭素ラジカル中心) 結合の結合解離エネルギーが  $40\sim 50\text{ kcal/mol}$  と、通常の  $\text{C}-\text{C}$  結合の強さの半分程度になってしまい、せっかく生成したスピン付加物通常の実験室内での保存では、変性が起こり易いことが分かった。しかしながら、ラジカル捕集粘土膜を用いてラジカルの捕獲を行えば、ラジカル付加物の分解や変性も起こらないことが示された。このラジカル付加物の、ラジカル捕集粘土膜中での安定性の高さの特性を活かし、例えば、自動車排気ガスを30分～1時間、ラジカル捕集粘土膜に被曝させることで、ラジカル成分の捕獲・検出が可能なることを、本研究で確認することができ、環境中のラジカル成分の分析に応用できることを示せた。

(3) ラジカル捕獲剤により捕獲した短寿命活性ラジカル種の同定に関しては、ソフトなイオン化を活用したMassスペクトル分析により検討を行った。ラジカル付加物は、粘土膜から取り出すと、容易に変性・崩壊してしまうので、粘土膜の状態のままの測定実験でMassスペクトルが得られるように工夫を凝らした。図1に示したラジカル捕獲剤 PTIO(B) (青色を示す) は、環境中の  $\text{NO}$  ガス(ラジカル)と選択的に反応することによって  $\text{NO}_2$  ラジカルが脱離して、黄色のイミノニトロキシルラジカルになることが報告されている(図2参照)。この特徴的な反応を利用して、PTIOをラジカル捕獲剤として粘土層間に担持させたラジカル捕集粘土膜を調製し、 $\text{NO}_2$  ガスと反応させることにより生ずるイミノニトロキシルラジカルを、ソフトイオン化

の手法を応用したMALDI-TOF Mass分析で観測することを試みた。

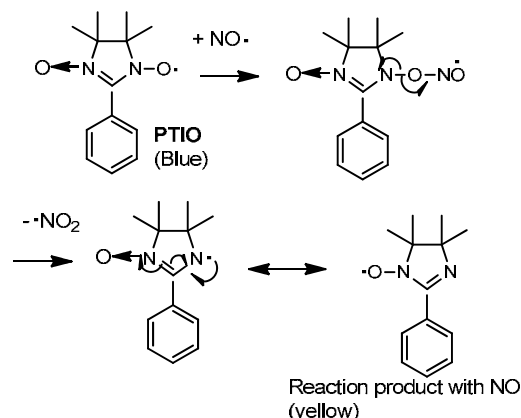


図2 ラジカル捕獲剤 PTIO と  $\text{NO}$  ラジカルの反応による黄色イミノニトロキシルラジカルの生成。

ラジカル捕獲剤の PTIO は分子イオンピークは、 $m/z: 233$  であり、 $\text{NO}$  ガスと反応して酸素原子が脱離して生ずる黄色のイミノニトロキシルラジカルは、分子イオンピークが  $m/z: 217$  に出現すると予想される。しかし、実際の Mass スペクトル測定で出現した親ピークは  $m/z: 219$  であり、これは、近接する粘土からプロトン(H)を2つもらってアンモニウムイオン構造を持った化学種であると考えられる。ラジカル捕集粘土膜中のラジカル捕獲剤 PTIO の分子イオンは  $m/z: 233$  にしっかりと観測されるので、ソフトなイオン化をして Mass スペクトル分析を行えば、粘土膜中でラジカル捕獲剤が活性ラジカル種を捕獲して生成したラジカル付加物の同定が十分に可能となると言える。

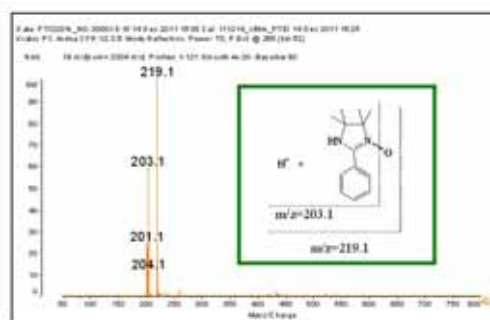


図3 ラジカル捕集粘土膜中のラジカル捕獲剤 PTIO が  $\text{NO}$  ラジカルと反応して生成した MALDI-TOF Mass スペクトルチャート

ソフトイオン化により出来るだけ  $S/N$  比の良い見やすい Mass スペクトルを得るためには、ラジカル捕獲剤ができるだけ効率良く活性ラジカルを捕獲するようにしなければならない。ラジカル捕集粘土膜中のラジカル



捕獲剤の捕獲効率を増大させるには、ラジカル捕獲剤の活性ラジカル種との接触面積を増大させることが有効であるので、調製したラジカル捕集粘土膜を粒径の揃った粒状にして、ラジカルとの反応性を確認する実験を行った。(図4参照)

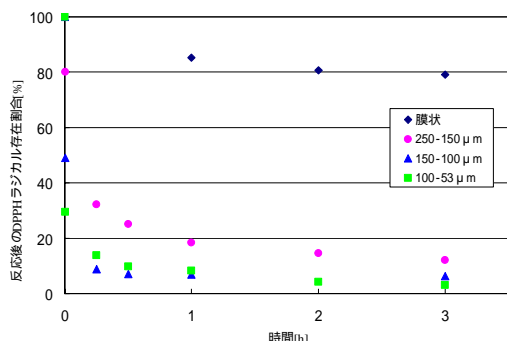


図4 DPPH をラジカル捕獲剤として使用したラジカル捕集膜の形状の違いによるラジカル捕獲効率の変化

図4に示されているように、膜の状態では反応させるより、細かい粒子として活性ラジカルとの接触表面積を大きくすると反応効率は大きく増大し、粒径が100 μm程度になると、捕獲効率が10倍以上向上することが分かった。粒子状にしても、ラジカル付加物の安定性は膜の状態の場合と比較して変わらず、確実にラジカル付加物の構造確認を行うことができる。

(4) 図1の(E)に示される分子内に蛍光発光能を持つ構造を有するラジカル捕獲剤は、ESR測定に加え、蛍光強度測定によっても活性ラジカル種の捕獲量を評価できることを確認した。捕獲剤(E)は、分子内にニトロキシル基を持つため、アントラセン骨格の蛍光発光能が著しく損なわれ蛍光を観測することができないが、安定ニトロキシル部位で活性ラジカル種を捕獲して、反磁性物質となると、強い蛍光発光能力を示すこととなる。従って、活性ラジカル捕獲に伴うESRシグナル強度の減少と、蛍光強度の増大は直線的な相関関係を持つことになるので、ESRシグナル強度減少度とともに、蛍光発光強度の増大をモニターすることにより、環境中の活性ラジカル種の定量を相補的な測定により、精度高く確実に行うことができる。われわれは、実験室系での実験で、フェニル基を分子内に持つアゾ化合物の熱分解によりフェニルラジカルを発生させ、ラジカル捕獲剤(E)を担持させたラジカル捕集粘土膜を用いてフェニルラジカルの捕獲実験を行い、フェニルラジカルの捕獲により、アントラセン骨格の励起一重項状態からの蛍光発光がきれいに観測できることを確認している。

(5) 今回の研究で、ラジカル捕集粘土膜を

用いた、短寿命活性ラジカル種の捕獲・定量および同定と構造確認の基礎的な分析法を確立することができたので、実際の環境下での活性ラジカル種捕獲実験を、国立環境研の「ナノ粒子健康影響実験棟」のディーゼル排ガス反応チャンバーを用いて、ディーゼル排ガス中の生体毒性の高いラジカル成分の捕獲・分析実験に取りかかっている。ディーゼル排ガスに揮発性有機分子や、酸化能力の高いオゾンのような物質が作用することで、有害なラジカル化学種が多く生成することを示唆する生物実験結果が報告されているので、応用実験を今後さらに行っていきたいと考えている。

また、昨年、東日本大震災による原子力発電所の損壊による、環境中の放射線線量の測定評価の重要性が広く国民の間で認識されるようになってきているので、「放射線の見える化」を具体的に実現できるような機能性物質の創製が社会から望まれている。今回、われわれが開発したラジカル捕集粘土膜は、粘土膜中に担持させる機能物質を、放射線線量に敏感に反応するものとするれば、十分に「放射線の見える化」を可能にする機能性物質に発展させることができると考えられる。放射線の照射により、ラジカル化学種が連鎖的に発生すれば、本研究で開発したラジカル捕集粘土膜中のラジカル捕獲剤が、発生したラジカル種を捕獲してラジカル付加物を生成し、その結果として、ラジカル捕集粘土膜の色が変わることによって、放射線の検出・定量に繋げることができると考えている。この、「放射線の見える化」実験は、産総研東北センターの蛭名武雄博士のチームと共同して行うことを計画しており、将来における支援をお願い致します。

さらに、これまでの研究により粘土層間に担持させる機能物質は、水溶性でアンモニウムイオンのように分子内に+電荷を持つものが粘土膜中により多く取り込まれ、ソフトイオン化 Mass 測定でS/N比の良いスペクトルが得られることが分かっている。従って粘土層間に機能有機分子を担持させ調製するハイブリッド膜の機能をさらに向上させる分子設計指針として、近年注目を浴びているイオン液体分子骨格に、これまでの研究で使用してきたラジカル捕獲剤官能基を組み込む事を考え、研究を継続して行こうと考えている。

#### 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4件)

K. Mori and K. Sakakibara, "Theoretical Study of Ionic Liquids on the Difference of Melting Points Between Tertiary and Quaternary Ammonium

