

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25810083

研究課題名(和文) 化学修飾カーボンナノドットによる生体関連物質・イオンの蛍光センシング

研究課題名(英文) Photoluminescent detection of biological materials and ions by chemically modified carbon nano dots

研究代表者

森田 耕太郎 (Morita, Kotaro)

金沢大学・物質化学系・助教

研究者番号：70396430

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)：カーボンナノドットそのものの反応性に着目した、亜硝酸イオンの蛍光検出系を構築した。亜硝酸イオンとの反応により、芳香族ジアミンのテトラゾニウムイオン化とそれに続く分解によるビスアリールラジカルの発生を利用し、CND 複合体形成により蛍光強度が減少することが分かった。この反応は亜硝酸イオンに特異的であるため、50 倍の妨害イオン共存下での亜硝酸イオンの検出が可能であった。CNDs の蛍光強度に対する、原料の元素組成の効果についても検討した。窒素や硫黄を含む原料から合成した CNDs は、蛍光量子収率が増大する傾向がみられ、グルタチオンから合成した CND の量子収率は 0.46 と見積もられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, a photoluminescent detection method for nitrite with high selectivity and sensitivity using CNDs is demonstrated based on the chemical reactivity of CND itself. We have shown the CND to be a novel photoluminescent probe for nitrite based on the specific reaction via aryl radicals generated from p-phenylenediamine diazotized by the nitrite. In the present method, nitrite can be selectively detected down to 1  $\mu$ M over several anions, such as nitrate, perchlorate, sulfate, fluoride, chloride, and bromide at mM levels. The photoactivity is also investigated by comparing six CNDs prepared from organic precursors having different elemental compositions. As a consequence, hetero atoms such as nitrogen and sulfur had a striking effect on the quantum yield. CND prepared from glutathione showed the quantum yield of 0.46. These results present evidence of the value of chemical modification of CNDs including the chemical reactivity of CND itself and hetero-atom doping.

研究分野：分析化学

キーワード：カーボンナノドット 蛍光センサー

### 1. 研究開始当初の背景

蛍光性をもつ半導体ナノ材料 CdTe や CdSe/ZnS などの量子ドットは、その高い光安定性から免疫測定や発光ダイオードなどさまざまな分野で利用されている。しかし、これらの量子ドットは、Cd や Se そのものの環境や生体に対する毒性や、水溶液中への分散性を保つために表面修飾が必要であるなどの課題も残されている。

これに対して、安価で毒性の低いナノ材料の一つとして、カーボンナノドット (CND) への注目が高まっている。CND は炭素を主成分とした直径 10 nm 以下程度の発光性をもつナノドットの種類であり、表面にカルボキシル基などの親水性官能基を持つため水溶液中に安定分散するとともに、炭素を主成分とすることから、環境や生体に対して無毒であるという特徴を合わせ持つ。

### 2. 研究の目的

CND はカーボンナノチューブの副生成物として 2004 年に発見された。その後もロウソクのスス、グラファイト基板のレーザーアブレーション、有機物の熱分解生成物などからも見いだされており、多彩な合成方法がこれまでも報告されている。CND は炭素を主成分として、その表面に酸素を含んだ官能基(-COOH, -OH, -C=O など)を持つ。CND の発光型センサーとしての利用が近年報告されるようになってきたが、その多くは CND 表面官能基と金属イオンとの配位に基づいた検出機構であり、現段階では CND の機能化や化学修飾による特定化学物質の可視化に関する報告は少ない。

本研究計画では、CND そのものの化学反応性に着目した、CND の発光応答変化に基づいた生体関連物質およびイオンの検出機構構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでの基礎検討として、グラファイトロッド電解法による CND の小スケール合成およびその発光特性評価に成功している。本研究計画では、マイクロ波照射法と電気炉熱分解法による CND 合成スケールの拡大から着手した。合成した CND は多段階のろ過と遠心分離によって精製し、紫外可視吸収スペクトルと発光・励起スペクトルを中心とした分光測定によって光学特性を評価した。また、赤外分光法、動的光散乱法、透過型電子顕微鏡観察によって含酸素表面官能基の存在と CND の構造を確認した。

マイクロ波照射法で合成した CND と *p*-phenylenediamine (*p*-PDA) による複合体形成に基づいた亜硝酸イオンの選択的発光検出機構を構築に取り組んだ。

電気炉加熱分解法による合成では、原料となる有機物の元素組成による、CND の発光特性に与える影響について詳細に検討した。

### 4. 研究成果

マイクロ波照射法による CND の合成では、水-ポリエチレングリコール混合溶液を溶媒、グルコースを原料として条件検討をした。テフロン耐圧容器と市販の電子レンジによって試料にマイクロ波を照射したところ、照射時間(2, 5, 10 分)に依存して CND の生成量が増大することが分かった(図 1)。

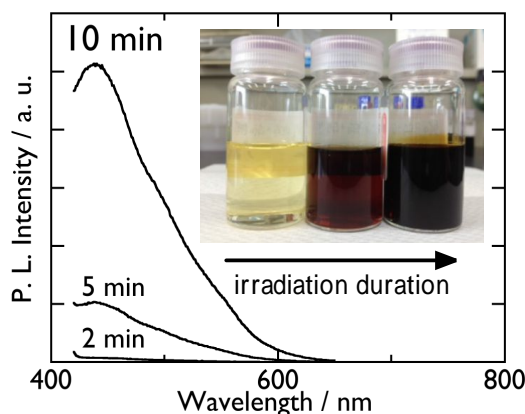


図 1. マイクロ波照射時間による発光強度変化。励起波長 = 360 nm。挿入図: CND 分散液。

芳香族アミンのジアゾ化反応に着目した亜硝酸イオンの選択的検出機構を構築した。試料溶液に塩酸酸性条件下で *p*-PDA を添加して、テトラゾニウムイオンを生成させた。試料溶液を塩基性 (pH 10) にすることで、テトラゾニウムイオンの分解にともなうビスアリアルラジカルの発生を促した。CND を添加することで、ラジカルが CND と反応し、CND 複合体の形成によって発光強度が減少することが分かった(図 2)。条件検討により、20  $\mu$ M までの亜硝酸イオンを選択的に検出できることが確認された。

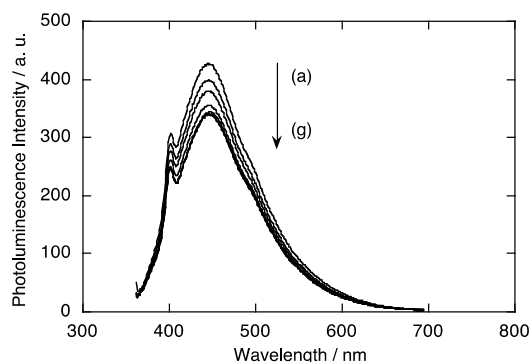


図 2. 亜硝酸イオンによる CND の発光強度変化。励起波長 = 353 nm, [*p*-PDA] = 10  $\mu$ M, (a)-(g) [NaNO<sub>2</sub>] = 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50  $\mu$ M, [buffer] = 20 mM, pH 10.2.

共存イオンとして、1 mM の硝酸イオン、硫酸イオン、過塩素酸イオン、フッ化物イオン、塩化物イオン、臭化物イオンがそれぞれ系内に存在していても、20  $\mu$ M の亜硝酸イオンのみを選択的に検出することが確認された。このことから、CND の化学反応性を併用することで、特異的な検出機構の構築が

可能であることを示した。

電気炉加熱分解法による CNД 合成では、窒素や硫黄などのヘテロ原子を含む有機物を原料とすることで、得られる CNД の発光強度が大幅に増大することを見いだした。

ヘテロ原子を含まない原料としてグルコースとデンプン、窒素原子を含む原料としてグリシンとキトサン、窒素と硫黄を含む原料としてシステインとグルタチオンを選択した。テフロン耐圧容器を反応容器として、原料 1 g を水 10 ml に溶解し、電気炉での加熱分解によって CNД を合成した。いずれの原料でも、反応時間は 2.0 時間、反応温度は 250 °C が最適条件であった。ろ過と遠心分離によって得られた合成収率は、いずれの原料でも 0.02 % 以下であった。グリシンを原料とした CNД の透過型電子顕微鏡画像を図 3 に示した。画像解析に基づく粒径分布から平均粒径は  $4.6 \pm 1.2$  nm と算出された。

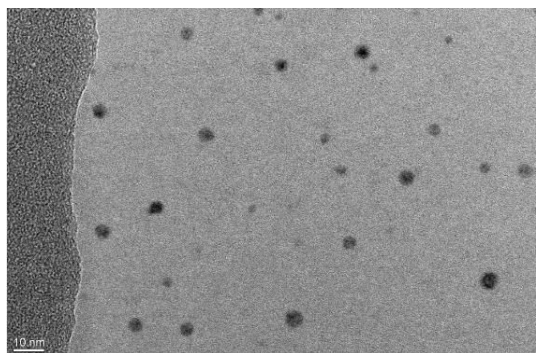


図 3. グリシンから電気炉加熱分解法で合成した CNД の透過型電子顕微鏡画像。

各原料から合成した CNД の励起極大波長における質量あたりの吸収係数は、ヘテロ原子の含有率に依存して増大する傾向がみられ、グルタチオンから合成した CNД (以下、GSH-CND) の  $6.2 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  を最大であった。硫酸キニネを標準として求めた相対発光量子収率は GSH-CND で約 0.46 となり、発光効率が半導体ナノドットに匹敵することが分かった。

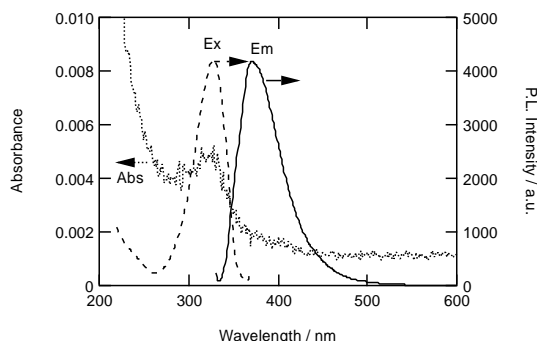


図 4. GSH-CND の吸収および発光スペクトル [CNД] = 1 mgL<sup>-1</sup>, pH 8,  $\lambda_{\text{ex}} = 326$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 373$  nm。

金属イオンの添加による CNД の発光挙動について、銅(II)イオン、鉛(II)イオン、カドミウム(II)イオンの効果について調べた。

グリシンやグルコースを原料とした CNД では、銅(II)イオンによって最大 80 %、鉛(II)イオンによって最大 30 % 消光することが確かめられた。一方で、窒素や硫黄を含む CNД では金属イオンによる消光作用は減少し、特に GSH-CND では 1 mM の金属イオン共存下でも 10 % 程度の消光作用しかみられず、金属イオンの影響を受け難い頑健な発光プローブとして利用できることが明らかとなった。

本研究計画における CNД の反応性や元素組成の制御に着目した CNД の化学修飾は、CNД の発光型センサーやプローブとしての利用可能性を拡大するものと位置づけられる。CNД は広範な pH やイオン強度などの水溶液条件においてもその発光特性を維持できることから、各種の分析化学反応と組み合わせることで、多様な標的物質の検出が可能となるものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Kotaro Morita, Kenichi Shibata, Hirohisa Nagatani, Naoki Hirayama, Hisanori Imura “Valence discriminative detection of metal cations by a chromotropic acid-grafted glassy carbon electrode” *Anal. Sci.*, **29** (1), 95–99 (2013), 査読有. [DOI: 10.2116/analsci.29.95]
2. Kotaro Morita, Kazuki Nakano, Hisanori Imura “The extraction of copper(I) ions with heterocyclic bidentate amines in the presence of glutathione” *Solvent Extr. Res. Dev.-Jpn.*, **21** (1), 1–7 (2014), 査読有. [DOI: 10.15261/serdj.21.1]
3. Kotaro Morita, Akane Kobayashi, Hirohisa Nagatani, Hisanori Imura “Photoluminescent Detection of Nitrite with Carbon Nanodots Prepared by Microwave-assisted Synthesis” *Anal. Sci.*, **31** (6), 481–485 (2015), 査読有. [DOI: 10.2116/analsci.31.481]

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 森田 耕太郎, 新田 允徳, 永谷 広久, 井村 久則 “キレート配位子含有イオン液体カーボンペーストの銅(II)イオン選択性電極としての利用” 第 73 回分析化学討論会, 北海道大学函館キャンパス (北海道, 函館市), 2013.5.19.
2. 森田 耕太郎, 小林 あかね, 土屋 真理央, 永谷 広久, 井村 久則 “マイクロ波照射および電解法によるカーボンナノドットの合成と蛍光イオンセン

サーとしての利用”

日本分析化学会第 62 年会, 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府, 東大阪市), 2013.9.11.

3. 森田 耕太郎, 林 拓人, 永谷 広久, 井村 久則  
“ジエチルアニリン修飾炭素電極における次亜塩素酸イオンの電気化学応答”  
第 74 回分析化学討論会, 日本大学工学部(福島県, 郡山市), 2014.5.24.
4. 森田 耕太郎, 中田 美寿々, 永谷 広久, 井村 久則  
“熱分解合成カーボンナノドットの発光特性に対するヘテロ原子導入の効果”  
日本分析化学会第 63 年会, 広島大学東広島キャンパス(広島県, 東広島市), 2014.9.17.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://chem.s.kanazawa-u.ac.jp/anal/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 耕太郎 (MORITA, Kotaro)  
金沢大学・理工研究物質化学系・助教  
研究者番号: 70396430

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: