

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410069

研究課題名(和文)現代病マーカー分子一酸化窒素の高選択的センサー電極の開発

研究課題名(英文)Development of a sensor electrode with high selectivity for nitric oxide as a marker molecule of modern disease

研究代表者

小澤 智宏(OZAWA, TOMOHIRO)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70270999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高選択NO分子を修飾した電極を作成に基づく生体NOセンシングデバイスの構築を目指した。電極表面に長鎖アルキル基を有する4級ホスホニウムイオンを修飾すると、アルキル基間の立体障害により分子間が離れて配置し空間が生じる。NO高選択性センシング分子をその空間に捕捉することで、センサー電極を調製した。センシング分子は3種類合成したが、その中で選択性に富んだ2種類を対象としてセンシング能の検討を行ったところ、そのうちの1つが10~150 ppb濃度のNOの検出を定量できることがわかった。また長鎖アルキルの長さをコントロールすると、応答速度を変えることが可能な空間を構築できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To construct an NO sensing device applied on the human body, a sensing molecules (metal complexes) with high NO selectivity were modified onto an electrode surface. Phosphonium ion with long alkyl chains was used as a modifier on the electrode together, which was possible to form spaces for the incorporation of sensing molecules by the steric hindrance between the alkyl chains. Three sensing molecules was prepared in this study, but two of them showed high NO selectivity. So, they were used for the preparation of the sensor. It was found that the electrode with a Co(III) complex with N2S2 coordination environment could detect 10~150 ppb of NO. Furthermore, TiO2 light-transparent electrode modified by the phosphonium also captured dye complex and the performance as the dye sensitized solar cell was improved by changing the alkyl chain length, which suggests that it is one of the important factors to optimize the sensing condition on TiO2 electrode.

研究分野：錯体化学

キーワード：生体一酸化窒素センシング 電極材料 表面修飾

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素(NO)及びその酸化物は大気汚染の原因物質として知られており、これまで工場や車の排気ガスからこれらをセンシングあるいは除去する技術に注力されてきた。ここでいうセンシングは、NO分子そのものであることはもちろんであるが、高温で空気と接触することからその酸化物も含めてのセンシングであった。したがってこれらのセンサーは主として高温で作用するものがほとんどであった。

1990年頃になるとNO分子は生体内での代謝に関わっていることが報告されるようになってきた。その後、血管弛緩作用、脳内情報伝達、免疫に関わる重要な小分子であり、それぞれの作用に対して適切な濃度が必要であることが示されてきた。例えば、血管弛緩作用では、NO合成酵素により生産されるNO分子がグアニル酸シクラーゼを刺激する信号分子として作用し、結果として血管が拡張して血圧を下げる効果がある。ここでの濃度は数十～数百ナノモルとされている。脳内情報伝達に関わるNO合成酵素でもほぼ同程度の濃度であることが知られており、これら2つのNO合成酵素は恒常的に発現しておりcNOSと呼ばれている。その一方で、外部から侵入した異物に対して作用する分子としても知られている。上記の通りNOラジカルに由来する細胞毒性を利用した免疫作用で、これは異物の侵入・発生によりNO合成酵素の発現が誘導されiNOSと呼ばれているが、生成するNOの濃度はcNOSに比べて100～1000倍であるとされている。そのため、血流等を利用して全身に異物が拡散すると、全身で通常の数百倍の濃度のNOが放出されることになり、短期的には急激な血圧降下が生じてショック状態を引き起こすため生命の維持に関わることになる。また慢性的には、発がんなどのリスクが高まることになる。こうしたことからNOの濃度を定量的に測定できるセンサーのような材料が予防医学の面からも期待されている。

上記の通りこれまでに開発されてきたNO_xセンサーは、高温で作用する(数百度)ものがほとんどでありかつNOに対する選択性は全く持っていないため、これらを生体内NOセンシングに用いることができない。一方で高感度NOセンシングは、装置の大きさにも依存し、大型装置ではサンプルを一度生体外に取り出して分析する必要がある。従って生体内での直接的な利用は期待できない。これに対して可溶性分子であり高感度であることが知られている蛍光の変化を利用したNOセンシング技術についても研究がなされてきているが、化学反応が主であるため応答が極めて遅く、また生体内への利用はその可溶性から生体への影響が懸念される。

このような技術と同時に、電極を用いたセンシング技術開発も進んでいる。電極センサーは小型化が可能であるメリットがあり、か

つ数ピコモル濃度のNOの検出が可能であるなど極めて高感度であることも知られている。主にNOの酸化電流(抵抗の変化)等を基準にセンシングがなされているが、NOの酸化により生じるNO_x関連分子も非常に近い酸化電位を有しているため、生体内では比較的高い濃度で存在する亜硝酸イオン(NO₂)が検出の妨げとなり、選択性に問題が生じる。これに対応するため、センサー電極表面を2次的に陰イオン交換膜(ナフィオン膜など)やガス透過性セラミックなどを被覆することでNO₂の電極表面への接近を阻害している。これにより選択性を向上させることが可能であるが、感度の低下や均質電極の作成に障害が生じる。そこで本研究では、分子修飾型NOセンサーの作成を試みることにした。

2. 研究の目的

本研究では分子修飾型NOセンサーの構築を目指す。上記の通り、電極そのものを用いたNOセンサーでは、2次的なイオン交換膜やガス透過性セラミックなどの被覆を必要とし、感度の低下を招くあるいは均質電極の作成ができないなど問題が生じる。一方で触媒を電極表面に修飾した修飾電極型NOセンサーも多く作成されているが、その能力は上記電極センサーと同程度であり、修飾分子に直接NO分子が相互作用するわけではないため、酸化電位に変化が生じず選択性を付与するためには2時的な被覆が必要であるのが現状である。このようにいずれも場合も選択性に問題が生じている。もし修飾分子にNOに対する高い選択性がある、あるいはNOとの相互作用により酸化電位がシフトし、その他のNO誘導體との電位に大きく差が生じるのであれば、この2次的な被覆の必要がないと考えた。本研究の前段階ですでにNOに対する高い選択性を示す金属錯体の開発に成功しており、電極表面への直接修飾を試みたが、分子の配向性がランダムでありかつ表面電場の影響を受けて金属イオンの還元電位が大きく負側にシフトする結果となった。これは水溶液中でセンシングする際に溶媒還元による電流発生に影響を受けることが予想され、本手法では解決できないことがわかった。

今回は、修飾分子の改良はもちろんのこと、電極表面の状態もコントロールして上記のような電場や外部バルク水の影響が少ない環境で修飾電極を作成することを考えた。

我々は、これまでに電極表面において高い置換基を用いると、その分子官に大きな空間が生じること、空間は分子を挿入するのに適した大きさであること、また、導入された錯体分子はその酸化還元電位がほとんど変化しないことを見出した。この反応場とNO高選択金属錯体を用いて、NOセンシング可能な電極材料を構築する。

3. 研究の方法

研究は、以下の3つに分け順次、場合によっては年度をまたいで実施した。その詳細を以下に述べる。

1 既存のコバルト錯体と新規錯体の合成

これまでの研究を通じて N₂S₂ 型コバルト(III)錯体が、NO に対して非常に高い選択性を持っていることがわかった。これは、金属イオンに対して強く電子供与することでルイス酸性度が減少し、金属イオンには電子供与性が強い単座配位子のみが相互作用可能な環境が形成されているためであると考えられた。しかしながら既存の錯体では、感度が減少し最大でもマイクロモル濃度の検出ができるのみであった。今回は、この分子を特殊な環境を有する電極に修飾するために再度合成を実施した。

上記の感度の低下に関する欠点に対応するために、新規配位子を合成することにした。新規配位子は N₂S₂ 配位子の電子供与が強すぎるためであると判断し、これを少し弱めることで解決できると考え設計した。合成した配位子は分光学的、電気化学的にキャラクタライズし、N₂S₂ 型コバルト(III)と同様、特殊な環境を持つ電極表面上に修飾した。

2 特殊な環境を有する電極の作成と NO センシング分子の導入

近年、イオン液体が様々な反応を活性化させることが報告されており、こうした環境を電極表面に応用することで、電気化学反応に有利な電極材料を構築できると考えた。末端に硫黄原子を持つ有機分子は、金・白金などの貴金属電極に対して自己集積が可能となり、単分子層を形成することは知られている。イオン液体の末端に硫黄原子を導入することで、イオン液体修飾電極ができると考えられる。ここでは分子間に NO センシング分子(金属錯体)を導入することが必要であるため、イオン液体に長鎖アルキル基を導入してその立体障害により分子捕捉可能な空間を導入することにした。

3 透明電極(酸化チタン電極)上への反応場の構築

光による NO 分子の脱着を電極上で実施することで、再生可能な NO センサーの構築ができると考えた。ここで透明電極としてよく用いられる酸化チタン電極を修飾基盤材料として用い、まずイオン液体分子を用いた表面修飾を試みた。2で構築した反応場において、NO センシング分子に適した修飾空間を提供することが、より高性能な電極材料として期待できると考え、修飾分子の長さの変化が分子捕捉環境に与える影響を検討した。酸化チタン表面での環境を評価する方法については、分光学的、電気化学的手法が用いられるが、本研究で用いる NO センシング分子はモル吸光係数が小さいため、既存の太陽電池色素剤をこれに変え、太陽電池システムを通じて実施した。

4 研究成果

上記実験手法 1~3 は時系列を伴うため、基金助成期間(3年間)の各年度におおむね従って実施した。

1 既存のコバルト錯体と新規錯体の合成

既存のコバルト錯体は、前回の同基金の助成により構築された分子の基礎骨格を用いた化合物である。本分子は NO に対する選択性が非常に高い分子であったが、NO に対する安定性が比較的小さく高い濃度の NO に対しては検出能力がある反面、生体においては恒常的に算出される NO 濃度に十分な対応ができないことが予想された。そこで NO 選択性を維持したまま NO に対する相互作用を増大させる必要があった。

一方本研究では、強い電子ドナー性を有する配位子を導入することで、NO に代表されるラジカル分子(イオン)とのみ相互作用させるというコンセプトに基づき分子設計を行ってきたが、このドナー性を少し弱くすることで、上記の条件を満たす分子が合成できると考えた。実際に合成した分子(金属錯体)の結晶構造を図1に示す。

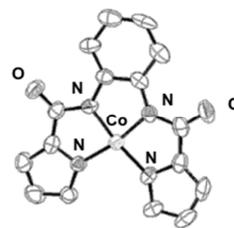


図1 新規 NO センシング分子

コバルトイオンの酸化数は+3価で、中間スピン状態を有する4配位平面型構造を有していた。これはこれまでに合成した NO センシング分子と同じ酸化数、構造であった。一方で、電気化学的な性質を知るためにサイクリックボルタメトリー測定を行ったところ、可逆性が高い酸化還元波を与え、その電位は-0.86 Vであった。この電位は同じフェロセンの酸化還元電位を基準とした場合、約 400 mV も正側にシフトしていた。これは中心金属イオン(Co(III))の d 軌道エネルギーが、既存の NO センシング分子に比べて低く、還元されやすい環境に置かれていることを示している。すなわち、配位子の電子ドナー性の減少により、中心金属イオンのルイス

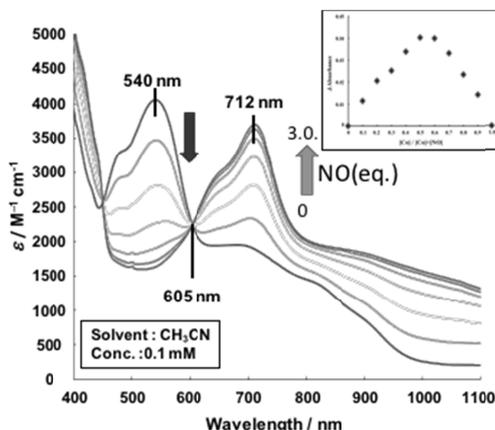


図2 NO 添加による吸収スペクトル変化

酸性度の増加が示唆された。次に NO との反応性について、分光学的、電気化学的に検討を行った。NO を飽和させたアセトニトリル溶液を逐次的に添加したところ、市外可視吸収スペクトルに変化が生じた。結果を図 2 に示す。3 当量を添加した時点でそれ以上の吸収スペクトルの変化は観測されなかった。Job プロット(図 2 挿入図)を実施したところ、NO とセンシング分子(錯体分子)との組成は 1 : 1 であることがわかった。この結果は逐次添加による 3 当量と矛盾するが、後述の通り同分子は可視光線照射による NO の脱離現象が見られたため、測定中に一部解離して両論量以上の NO 濃度が必要であったためであると考察できる。

NO を添加すると酸化還元電位も変化する。図 3 にその変化を示した。可逆的であった酸

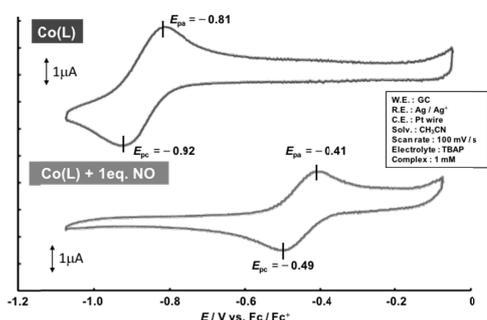


図 3 NO 添加前後のサイクリックボルタグラム
化還元波は、NO の添加に伴い正の電位領域にシフトしていることがわかった。中心金属イオンの低酸化状態を安定化したことから、NO との相互作用にはπ-逆供与性があると考えられる。

NO 付加体のアセトニトリル溶液を蛍光灯下に数時間置いておくと色変化が見られ、元の吸収スペクトルとほとんど一致した。このことは、NO 付加体が可視光照射により NO 分子を放出することを示している。

以上の通り、今回合成した Co(III)錯体(図 1)は NO のセンシング能力(酸化還元電流値の変化)を有し、かつ捕捉した NO 分子を光照射によりセンシング分子を再生できることがわかった。

2 特殊な環境を有する電極の作成と NO センシング分子の導入

これまでの研究から、長鎖アルキル基を有するイオン液体型ホスホニウムイオンは、金電極上に修飾されると、その立体障害とホスホニウムイオンの静電反発により、修飾ホスホニウムイオン間隔が大きくなり、錯体分子を十分に捕捉可能な空間を形成する。この空間には、電荷に依存せず錯体分子の捕捉が可能であり、また直接的な電極表面との接触を避けることができるため、均一溶液中でのキャラクターを維持できる特性がある。本研究では、この空間を利用することにより、均一系での性質(上記 1 の結果)を維持したまま NO センサーを構築できると考えた。

修飾状態を検討するために用いたセンシング分子には、新規分子(図 1)が水に難溶性で均一系との比較ができなかったため、水溶性であり同じ平面構造を有しかつ NO 2 当量と反応してジニトロシル錯体を形成しうる既存の N₂S₂ 型コバルト(III)錯体を用いた。本分子の均一系におけるセンシング能については、以前の科研費(基盤研究 C)の報告

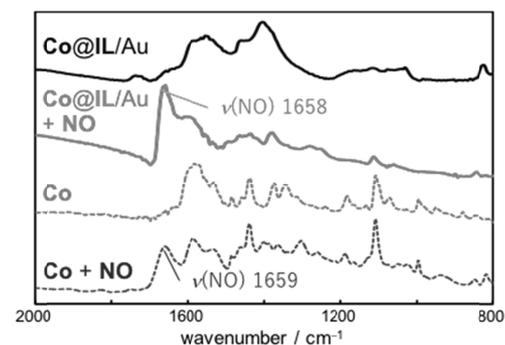


図 4 N₂S₂ 型コバルト(III)錯体(センサー)分子(Co)とその修飾電極(Co@IL/Au)における NO 添加前後の赤外吸収スペクトル

書に記載してあるため、ここではその詳細は割愛する。センシング分子をアセトニトリルに溶解し、そこに修飾電極を数時間浸漬して NO センサーを調製した。その後、蒸留水で十分に洗浄して測定に用いた。表面修飾されたセンシング分子の状態を知るために、赤外分光法を用いて評価した(図 4)。まず NO ガスを嫌気条件下で導入した場合の変化を赤外吸収スペクトルで追跡した。その結果、導入後に NO 付加体の生成によると考えられる N-O 伸縮振動が 1658 cm⁻¹ に新たに検出された。この値はフリーの NO ラジカル(1840 cm⁻¹)と同程度であり、NO 分子はラジカル状態でコバルト錯体に配位結合していると考えられる。またこの値は均一系における NO 付加体の値(1659 cm⁻¹)と同じであり、付加体の構造は均一系の構造を維持していることが示唆された。次に 0.1M 過塩素酸水溶液中における NO との反応性について検討した。NO 添加前に観測された -0.36V の還元波は NO 添加により -0.49V へとシフトした。これは均一系で観測された -0.45V から -0.61V への変化(0.1M 過塩素酸水溶液)と非常に類似しており、均一系での構造、性質をほぼ保持していることがわかった。またそのセンシング能を電流値として測定したところ、40nA/ppb の感度で検出可能であること、また上限が 160ppb 程度であることがわかった。

3 透明電極(酸化チタン電極)上への反応場の構築

2 で用いたイオン液体分子は酸化チタン電極の表面に対して安定に化学吸着できない。そこで相互作用部位をチオールからカルボキシレートに変えた分子を新たに合成してその電極表面の状態を検討した。表面の評価

方法は酸化チタン電極が色素増感型の太陽電池で用いられる電極材料であること、またその能力が色素剤の置かれた状態を鋭敏に反映することを考慮し、イオン液体修飾酸化チタン電極に市販の色素剤(N3)を挿入して実験を行った。

赤外吸収スペクトルを測定したところ、イオン液体と N3 色素を導入した酸化チタン電極には、両分子の吸着に由来する C-H 伸縮、変角振動が確認されたこと、また IPCE スペクトルの挙動が、N3 色素と酸化チタン電極のみの系と類似した結果であったことから、目的の修飾電極の調製に成功したと考えられる。

この電極を用いて太陽電池(対極: Pt, 電解質: LiI-I₂)を作成し、そのパフォーマンスを検討した。イオン液体分子を導入される前の系に比べて、太陽電池の能力を示す変換効率、解放電圧、短絡電流密度は全て 20%以上の向上が見られた。特に解放電圧の増加は電荷再結合が抑制されていることを意味しており、N3 色素分子がイオン液体に保護され、電解質との相互作用が妨げられていると考えられる。

これまでの評価で用いたイオン液体では、電極表面からの炭素鎖数が 1 1 であったが、次に炭素鎖数を 4 まで短くして分子捕捉空間の制御と修飾電極の性質を評価した。イオン液体分子数に対する N3 分子の導入比が 1 1 炭素鎖に対して約 70%程度であったが、そのパフォーマンスはほぼ同程度であった。これは 4 炭素鎖であっても十分に溶媒層から保護された環境を維持できることを示している(図 5)。本研究では NO 分子をセンシ

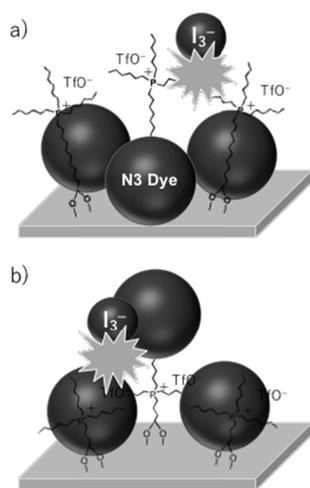


図 5 電極表面イメージ a) 11 炭素鎖長 b) 4 炭素鎖長

ングする必要があるため、分子の安定化を達成しかつ高いセンシング能力を維持する必要があるため、4 炭素鎖程度の短い修飾分子により構築される空間が適していると考えられる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 4 件)

1 Immobilization of a Cobalt(III) Complex Possessing a Selective Nitric Oxide Capturing Ability onto an Ionic Liquid-modified Au Electrode: Reactivity of the Electrode toward Nitric Oxide
Tatsuya Kitagawa, Takuma Yano, Tomohiko Inomata, Tomohiro Ozawa, and Hideki Masuda
Chem. Lett., **2016**, 45(4), 436-438. 査読あり 10.1246/cl.151199

2 Immobilization of a non-heme diiron complex encapsulated in ammonium type ionic liquid layer modified on a Au electrode: Reactivity of the electrode for O₂ reduction
Tatsuya Kitagawa, Junpei Nishino, Tomohiko Inomata, Tomohiro Ozawa, Yasuhiro Funahashi, and Hideki Masuda
Chem. Commun., **2016**, 52, 4780-4783. 査読あり 10.1039/c5cc10263d

3 Electrochemical conversion of dinitrogen to ammonia induced a metal-complex supported ionic liquid.
Akira Katayama, Tomohiro Inomata, Tomohiro Ozawa, and Hideki Masuda
Electrochem. Commun., **2016**, 67, 6-10. 審査読あり 10.1016/j.elecom.2016.03.001.

4 A Novel Square-planar Ni(II) Complex with an Amino-carboxamido-dithiolato Type Ligand as an Active Site Model of NiSOD"
Daisuke Nakane, Yuko Wasada-Tsutsui, Yasuhiro Funahashi, Tsubasa Hatanaka, Tomohiro Ozawa, Hideki Masuda
Inorg. Chem., **2014**, 53 (13), 6512-6523 査読あり 10.1921/ic901246w

〔学会発表〕(計 2 1 件) (平成 28 年度 MRS2016)

1. シデロフォア-薬複合体によるドラッグデリバリーシステム(DDS)を指向した NO 放出錯体の構築)

後藤 稔・木本 雄也・猪股 智彦・小澤 智宏・増田 秀樹

(平成 28 年度 錯体化学会第 6 5 討論会)

2. Co(III) Complex Showing Selective and Reversible Binding Against Nitrogen Oxide
Tomohiro Ozawa, Yuya Kimoto, Tomohiko Inomata,¹ Wonwoo Nam, Hideki Masuda

3. 選択的一酸化窒素センシングを指向したアミド-アルコキソ型配位環境を有する Co(III)錯体の構造と反応性

三品 律子、伊藤 大展、木本 雄也、猪股 智彦、小澤 智宏、増田 秀樹

(平成 28 年度 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム)

4. 抗菌性一酸化窒素を外場応答により放出可能な金属錯体の合成と性質

後藤 稔、木本 雄也、猪股 智彦、小澤 智宏、増田 秀樹

(平成 28 年度 第 47 回中部化学関係学協会
支部連合秋季大会)
5. 光制御可能な一酸化窒素放出金属錯体の
合成とその抗菌性能の評価
後藤菜、木本雄也、猪股智彦、小澤智宏、増
田秀樹
(平成 28 年度 PRIME 2016)
6. Improvement of the DSSC performance by
using a phosphonium-type ionic liquid
modified TiO₂ electrode
Ayaka Matsunaga, Tomohiko Inomata,
Tomohiro Ozawa, Hideki Masuda
(平成 28 年度 日本化学会春季年会)
7. 選択的一酸化窒素センシングを指向した
平面 4 配位構造を有する Co(III)錯体の構築
三品律子・小澤智宏・猪股智彦・増田秀樹
8. Synthesis of some N-4-type Co-nitrosyl
complexes and hte substituent effect for
their properties.
(Nagoya institute of Technology) Goto
Shiori, Kimoto Yuya, Inomata Tomohiko,
Ozawa Tomohiro, Hideki Masuda
9. Syntheses and Polymerization Reaction
of Potically Active Cobalt(III) Complexes
Minami Nakashima, Moe Matsubara, Tomohiro
Ozawa, Toshiaki Yonemura
10. イオン液体修飾チタニア電極を用いた
色素増感型太陽電池
松永彩花・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹
(平成 27 年度 MRS2015)
11. 一酸化窒素の可逆的脱着能を示す平面
四配位型 Co(III)錯体
木本雄也、猪股智彦、小澤智宏、CHO
Jaeheung, NAM Wonwoo, 増田秀樹
(平成 27 年度 錯体化学会第 5 6 回討論会)
12. Ionic liquid-modified Au electrode
immobilizing Co(III) complex: Its
reactivity toward NO
Tatsuya Kitagawa・Takuma Yano・Yuya
Kimoto・Tomohiko Inomata・Tomohiro
Ozawa・Yasuhiro Funahashi・Hideki Masuda
(平成 27 年度 CSJ 化学フェスタ 2015)
13. 選択的な NO 応答性を示す Co 錯体及びイ
オン液体を利用した NO センサー材料の開発
北川竜也・矢野卓真・猪股智彦・小澤智宏・
増田秀樹
14. イオン液体修飾チタニア電極を用いた
色素増感太陽電池の評価
松永彩花・金 光柱・猪股智彦・小澤智宏・
増田秀樹
(平成 27 年度 日本化学会春季年会)
15. アニオン性 N2O2 型配位子を用いた銅錯
体の合成及び反応性
扇玉智徳・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹
16. 選択的一酸化窒素センシングを指向し
た N2O2 型配位環境を有する Co(III)錯体の構
築
三品律子・小澤智宏・猪股智彦・増田秀樹
(平成 26 年度 錯体化学会第 6 4 回討論会)
17. NO 選択性を有するコバルト錯体の構築

と配位挙動
木本雄也・和佐田裕子・猪股智彦・小澤智宏・
増田秀樹
(平成 26 年度 41st International
Conference on Coordination Chemistry)
18. Construction of sensing materials with
high NO selectivity using metal complex
Tomohiro Ozawa, Hironori Ito, Takuma
Yano, Yasuhiro Funahashi, Tomohiko
Inomata, Wonwoo Nam, Hideki Masuda
(平成 26 年度 第 4 5 回中部化学関係学協会
支部連合秋季大会)
19. 高選択 NO センシング分子の構築とセン
サーへの展開
小澤智宏
(平成 26 年度 Active Enzyme Molecular)
20. Development of a novel nitrile
hydration catalyst introduced structure
concept of nitrile hydratase
Hiroki Ando, Tomohiko Inomata, Tomhiro
Ozawa, Hideki Masuda
(平成 26 年度 日本化学会春季年会)
21. 銀-コバルト混合錯体の形成に及ぼす芳
香族チオラト配位子の影響(5)
加藤匠・伊藤勇輝・小澤智宏・米村俊昭

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 智宏 (OZAWA, Tomohiro)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教
授
研究者番号：70270999

(2) 研究分担者

米村 俊昭 (YONEMURA, Toshiaki)
高知大学・教育研究部総合科学系・教授
研究者番号：90240382

猪股 智彦 (INOMATA, Tomohiko)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教
授
研究者番号：40397493