

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K04896

研究課題名(和文) 生体内に混入した水銀イオンの除去を目的とする水銀吸着プローブの開発

研究課題名(英文) Development of a mercury adsorption probe aimed at the removal of mercury ions incorporated into living organisms

研究代表者

瀧本 竜哉 (Takimoto, Tatsuya)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：10590044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：カリックス[4]チアクラウン(CA4SC5)の合成反応は低収率であったが、反応条件の検討を行うことにより、80%程まで収率が向上した。次に、CA4SC5の水銀の捕捉能の評価方法について検討を行った。CA4SC5が水銀を捕捉した際、NMRスペクトルのクラウン部位のシグナルは低磁場へシフトするが、その度合いによって溶媒のシグナルと重なり正確な捕捉能の評価ができないことが問題となった。我々は水銀を捕捉した際、CA4SC5の構造が変化することに気づき、CA4SC5のt-Bu基やベンゼン環のプロトンの挙動を追跡することにより、その結合能を評価できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会的意義は、地球上へ水銀の排出量が増加している昨今、水銀を選択的に捕捉する技術は重要である。また、その技術の向上のためには、その捕捉能を簡便に評価する方法もまた重要である。今回はそれらの技術を開発した研究内容となっている。

次に学術的意義は、CA4SC5が水銀イオンを捕捉した際に、その結合能に比例して構造が変化することを見出した。CA4SC5の様にリジットなシクロファンは、錯体形成の度合いに比例して全体の構造が変化することを分かり、リジットなシクロファンの結合定数を求める際に、NMR滴定が有力な方法になることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The synthesis reaction of calix[4]thiacrown (CA4SC5) initially had a low yield, but by optimizing the reaction conditions, the yield was improved to approximately 80%. Next, we investigated the method for evaluating the mercury capture ability of CA4SC5. When CA4SC5 captures mercury, the NMR spectrum signals of the crown region shift to a lower field, but the degree of this shift overlaps with the solvent signals, making it difficult to accurately evaluate the capture ability. We noticed that the structure of CA4SC5 changes when it captures mercury, and found that we could evaluate its binding ability by tracking the behavior of the t-Bu groups and benzene ring protons of CA4SC5.

研究分野：環境化学

キーワード：チアクラウン部位導入反応 水銀イオン選択的捕捉 水分散性ナノダイヤモンド カリックス[4]チアクラウン-5 ヘテロシクロファン 有機水銀(II)化合物 NMR滴定 計算化学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

途上国の水銀被害または水銀の越境被害の防止を目的として「水銀に関する水俣条約」が国際条約として2013年に決定された。その条文に、途上国の水銀回収・リサイクル技術の支援が決定されており、我々は上記技術の確立を目指し、*p*-*tert*-butylcalix[4]thiacrown-5 (CA4SC5) が水銀イオンを選択的に捕捉可能か、また各水銀化合物に対する結合定数等を調査し、その後、CA4SC5 含有吸着剤の調製を目指している。

2. 研究の目的

我々は環境水中に溶存する水銀イオンを選択的に回収・除去する吸着剤の開発を目指しており、吸着剤として CA4SC5 含有吸着剤の調製を試みている。そのための研究目的は以下の4つに分類される。

- (1). CA4SC5 のチアクラウン部位の導入反応 (Scheme 1) において、80%以上の収率向上を目指す。
- (2). 種々の金属イオンが共存する溶液中から、CA4SC5 が水銀 (II) イオンのみを選択的に捕捉するか確認する。
- (3). CA4SC5 の様々な水銀化合物に対する結合定数を ¹H-NMR スペクトル滴定を用いて結合定数を算出する。
- (4). CA4SC5 をナノダイヤモンド (ND) 表面へ固定し、水銀吸着プローブを調製する。その後、吸着実験を行い、飽和吸着量を算出し、その吸着能を調べる。

3. 研究の方法

- (1). 水銀吸着剤の細孔として用いるカリックス [4] チアクラウン-5 (CA4SC5) の合成収率の向上
 - ・クラウン部位導入時の環化反応において、塩基の塩基性度が反応に及ぼす影響の検討
 - ・分子内環化反応が優先的に起こる条件の検討
- (2). 各種水銀イオンに対する CA4SC5 類の捕捉能の調査
 - ・各種水銀 (II) イオンおよび他の金属イオンに対する捕捉能の検討
 - ・CA4SC5 類の結合定数の決定および飽和吸着量の算出
- (3). CA4SC5 の高分子膜への固定およびクラウン部位の変換

4. 研究成果

まず、研究目的(1)の「CA4SC5 のチアクラウン部位の導入反応」についての研究成果を報告する。

Figure 1 に今回研究対象として用いた CA4SC5 の構造式を示す。これまでの検討結果より、CA4SC5 は水銀イオンを捕捉することが分かっている。しかし、dibromoethylcalix[4]arene **1** と 2,2'-thiobis(ethane-1-thiol) **2** からの CA4SC5 の合成収率は32%と低く、また反応時間も5日と長い。そのため、まず、収率の向上を目指し反応の条件検討を行った。

溶媒に THF を用いると原料消失に5日を要した反応が DMF を用いると1日に短縮できた。塩基として炭酸カリウム (K₂CO₃) を用いた反応では収率が50~70%であったが、同程度の pK_b を持つトリエチルアミン (NEt₃) を用いると収率は同程度なものの原料消失に7日間を要した。

また、より pK_b の高い 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene (DMAN) を添加するも、原料の消失が見られなかったが、1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) を塩基として用いると2時間で原料の消失がみられ、反応時間は劇的に短縮した。さらに、これらの結果より、基本的に塩基は塩基性度が高いほど反応は速く進むが、塩基の立体障害が大きいと反応の進行が著しく低下することが分かった。しかし、反応時間が短縮されたものの低収率であったため、さらに合成条件や精製方法についても検討を行った。

次に塩基や**2**の滴下、精製方法についての検討結果をTable 1へ示す。反応はThin-Layer Chromatography (TLC) で追跡し、原料が消失した時点を反応の終点とした。溶媒量は基本的にDMF 25 mlとした。まず反応温度について、室温で反応を行うと目的物は得られたものの多くの原料が残存し得られた目的物は微量で単離が行えなかった。また、40℃の反応条件下、精製法として、ヘキサンを用いて洗浄すると、各々53、48%と収率が低下した。また50℃で反応後、クロロホルム-メタノール再沈殿法により65%の収率で目的物が得られ、少し収率が向上した。**2**をDMF 25 ml 中10 mlに溶解し30分かけて滴下し反応を進めると74%と収率が向上したが、溶媒量を50 mlと2倍量用いその内25 mlに**2**を溶解し滴下した場合、その収率は58%に低下した。DMF 10 mlに溶解した**2**をシリンジより直接注入すると収率は81%と反応系の中で最も高い値を示した。溶媒にCHCl₃を用いた場合、TLCより目的物が確認されるものの1週間の反応で原料の消失が確認されなかつ

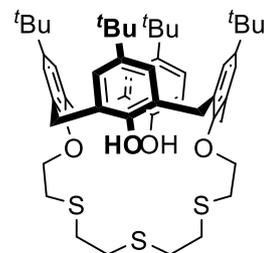


Figure. 1. *p*-*tert*-butylcalix[4]thiacrown-5 (CA4SC5).

結合定数について、我々は NMR スペクトル測定により結合定数の算出を試みた。CA4SC5 が水銀イオンと結合した際、チアクラウン部位のシグナルは低磁場シフトする。しかしその際、メタノールや水の測定溶媒に含まれるシグナルに被ってしまい、正確な結合定数が算出できない。今回、CA4SC5 が水銀イオンと錯体構造を形成すればするほど、その水銀との親和性に応じて錯体も構造が変化することを見出した。

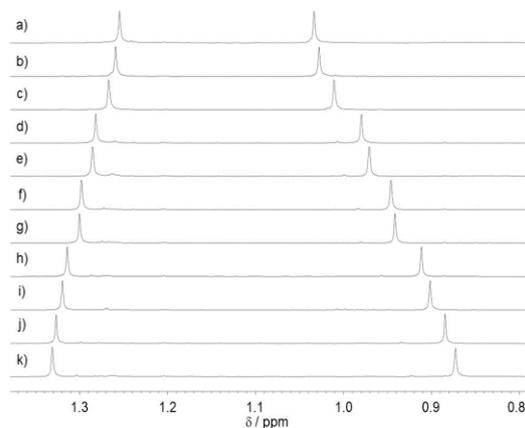


Figure 3. $^1\text{H-NMR}$ spectra of a) **2** with b) 0.375, c) 0.5, d) 0.75, e) 1.0, f) 1.5, g) 2.0, h) 3.0, i) 4.0, j) 6.0, k) 8.0 equivalents of HgCl_2 to 1.0 mM of **2**. $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD-d}_4$ (17/3, v/v) was employed as a deuterated solvent. These spectra were exhibited around the signals of *t*-butyl groups of the spectra.

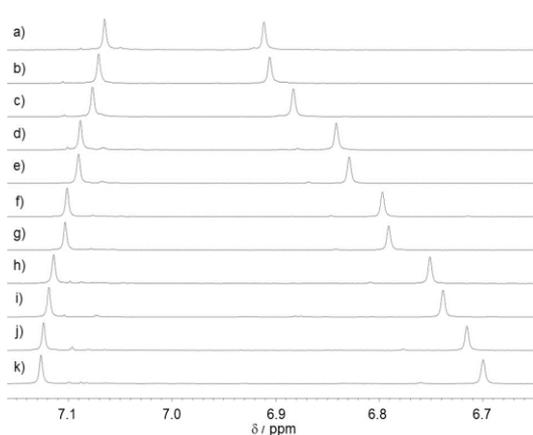


Figure 4. $^1\text{H-NMR}$ spectra of a) **2** with b) 0.375, c) 0.5, d) 0.75, e) 1.0, f) 1.5, g) 2.0, h) 3.0, i) 4.0, j) 6.0, k) 8.0 equivalents of HgCl_2 to 1.0 mM of **2**. $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD-d}_4$ (17/3, v/v) was employed as a deuterated solvent. These spectra were exhibited around the signals of phenolic groups of the spectra.

Table 2. The binding constants calculated from the changes in each proton signal, *tert*-butyl, thiacro and phenolic ring moieties.

En	Mercury(II)	<i>tert</i> -	<i>tert</i> -	Thiacro	Thiacro	Phenoli	Phenoli	Total ¹
tr	compound	Butyl-H ^g	Butyl-	wn-H ^a	wn-H ^b	c ring-	c ring-)
y			H ^h			H ⁱ	H ^j	
1	HgCl_2	753 ± 76 (n=10)	834 ± 66 (n=10)	84570 (n=6)	905 ± 89 (n=7)	735 ± 78 (n=10)	919 ± 72 (n=10)	756 ± 38
2	HgBr_2	1421 ± 154 (n=10)	1401 ± 142 (n=10)	1554 ± 183 (n=9)	1185 ± 179 (n=7)	1432 ± 154 (n=10)	1378 ± 160 (n=10)	1424 ± 73.7
3	$\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	72244 ± 17670 (n=10)	73581 ± 16840 (n=10)	63281 ± 10560 (n=8)	68171 ± 8773 (n=6)	76200 ± 17613 (n=10)	67587 ± 15820 (n=10)	74449 ± 8466
4	$\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	16661 ± 5298 (n=10)	16439 ± 5522 (n=10)	19780 ± 8893 (n=8)	15526 ± 5640 (n=9)	16739 ± 5266 (n=10)	15991 ± 6112 (n=10)	16652 ± 2561

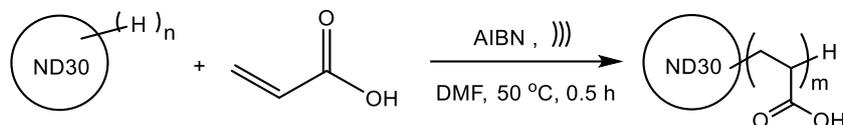
¹⁾ The total binding constants obtained from the transition of four protons, H^g, H^h, Hⁱ, H^j. n is the number of measurement points used in the calculation of the coupling constant, excluding the origin point.

そのため、*tert*-butyl 基やベンゼン環部位の NMR スペクトルのシグナルの変化の度合いより、結合定数の算出を試みた (Fig. 3, 4)。その結果、結合定数はクラウン部位のみから得られた値より、正確性が向上した (Table 2)。さらに、*tert*-butyl 基やベンゼン環部位のシグナルはカップリングしておらず、そのケミカルシフトを読み取りやすい。

この様に (2)、(3) の結果より、CA4SC5 は水銀(II)イオンを選択的に捕捉することが分かっただけでなく、その吸着能を測定する際に、クラウン部位だけでなく、*tert*-butyl 基やベンゼン環部位の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルのシグナルの変化より、結合定数を算出できることが分かり、また、これらの値を用いることにより、より正確な値を算出できた。これは、今回の研究により、結合の強さと錯体構造全体の配座変化の度合いが比例関係にあることが分かり、金属錯体を形成する同様なシクロファン捕捉能を簡便に算出する際は役立つことが期待される。

最後に研究目的(4)の「CA4SC5をND表面へ固定し、水銀吸着プローブを調製する。」の研究結果の進捗状況について報告する。本研究は、表面が水素化された平均粒子径 30 nm のND表面でアクリル酸を重合し、アクリル酸ポリマーをその表面へ固定し親水性NDとした後、その末端へCA4SC5を付与し、まずは水銀吸着NDを調製することが目的となっている。

今回、Scheme 2 の様にラジカル開始剤に 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN)を用いて、50°Cで30分超音波を照射した。精製はアセトンや水を用いて遠心分離により行った(Scheme 2)。



Scheme 2. Preparation of nanodiamond with polyacrylic acid polymer fixed to its surface.

まず、今回は表面を水素化したNDを40 mg用いて、アクリル酸の量をa)2, b)3, c)4 mlと種々変化させ加え、得られたアクリル酸ポリマー固定NDの粒径を動的分散乱法(DLS)により測定した(Fig. 5)。その結果、平均粒径が30 nmであったNDは、ポリアクリル酸の導入によりその平均粒径がa) 481.5、b)252.7、c)746.2 (nm)と主に3つのサイズが確認された。

[粒子径]

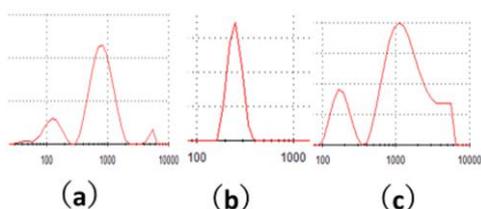
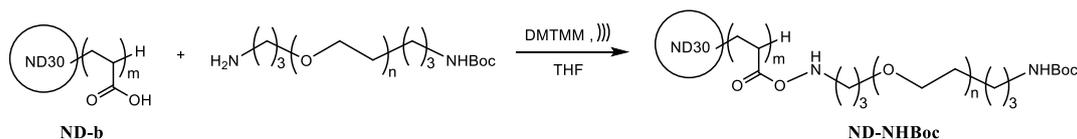


Figure 5. Average particle size of compound 3 measured by DLS. The comparison was made with the addition of acrylic acid in quantities of a) 2 ml, b) 3 ml and c) 4 ml, respectively.

Table 3. Comparison of the elemental analysis of the obtained polyacrylic acid ND with different amounts of added acrylic acid [a) 2 ml, b) 3 ml, c) 4 ml].

	Elemental analysis (%)			
	C	H	N	O
ND	97.99	0.53	0	0.42
ND-a	83.72	1.96	0.20	12.39
ND-b	82.77	2.17	0	15.08
ND-c	82.96	2.03	0.14	12.65

また、各々の元素分析の結果を示す (Table 3)。本結果より、ND-bが酸素の含有量が多く、より多くのアクリル酸ポリマーがND表面上へ固定されていることが予想される。



Scheme 3. Preparation of ND-NHBoc.

次に、得られたND-bと *tert*-butyl 13-amino(4,7,10-trioxa-tridecanyl)carbamateを加え、縮合剤 4-(4,6dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMTMM)を用いて、末端をアミノ基へ変換した(Scheme 3)。得られた生成物の確認はIRにより行い(Figure 6)、カルボン酸のカルボニルの振動の他にアミド基のカルボニルおよびアミドのN-Hの振動が新たに確認され、目的物ND-NHBocが得られたと考えられる。さらに、紙面の都合上ここでは示していないが、DLSにより得られたNDの平均粒径は322 nmであり、粒径はあまり増大していなかった。次いで末端Boc基を脱保護しNDの調製は終了したが、CA4SC5をそのアミノ基へ導入するため、CA4SC5ヘリンカーの導入を試みたが導入に失敗し水銀吸着NDの調製はできなかった。今後は水銀の吸着部位に当研究室で開発したピチアゾロファンを用いて行う事にしており、既にそれは水銀を吸着することが分かっており、またリンカーの導入にも成功している。今後はピチアゾロファンを用いた水銀吸着NDの調製を行う予定である。

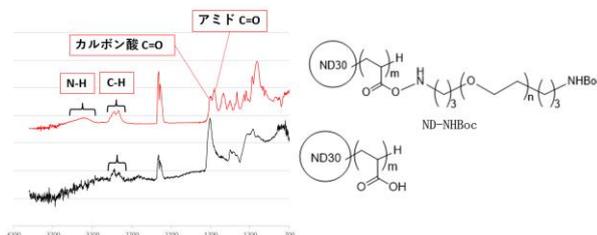


Figure 6. 得られたND-NHBocのIRスペクトル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 瀧本 竜哉, 橋本 悠, 井上 元, 日置 和人, 佐々木 秀明
2. 発表標題 カリックス[4]チアクラウン 5の有機・無機水銀(II)化合物に対する選択的捕捉能の検討
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 瀧本 竜哉, 橋本 悠, 井上 元, 日置 和人, 佐々木 秀明
2. 発表標題 Study of the mechanism of selective recognition of p-tert-butylcalix[4]thiacrown-5 for organic mercury(II) compounds
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Tatsuya Takimoto, Yuu Hashimoto, Gen Inoue, Hideaki Sasaki
2. 発表標題 Analysis of mercury(II) recognition ability and study on synthesis condition of p-tert-butylcalix[4]thiacrown-5 aiming at selective removal of mercury(II) species in human body
3. 学会等名 The 17th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology (IDDST-2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Takimoto, Y. Hashimoto, G. Inoue, H. Sasaki
2. 発表標題 Analysis of mercury(II) recognition ability of p-tert-butylcalix[4]thiacrown-5 aiming at selective removal of organic mercury(II) species dissolved in water media by using calix[n]thiacrown as an adsorbent
3. 学会等名 70th Southeastern Regional Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuya Takimoto, Yuu Hashimoto, Gen Inoue, Hideaki Sasaki
2. 発表標題 Analysis of mercury(II) recognition ability and study on synthesis condition of p-tert-butylcalix[4]thiacrown-5 aiming at selective removal of mercury(II) species in human body
3. 学会等名 IDDST-2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 秀明 (Sasaki Hideaki) (30122245)	神戸学院大学・薬学部・教授 (34509)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------