

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550073

研究課題名(和文)有機 無機ハイブリッド型高選択一酸化窒素センサーの開発

研究課題名(英文)Development of an organic-inorganic hybrid-type nitric oxide sensor with high selectivity

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で血管弛緩、免疫などに関与している一酸化窒素(NO)は、作用に応じた適量が決まっているが、いったんその濃度が変化すると動脈硬化や敗血症など重篤な病気を引き起こす。本研究では生体内NO濃度に着目し、これをセンシング可能なシステムの構築を目指した。強い電子供与により正味の正電荷が減少した金属イオンは、外部からのさらなる電子供与に対して抵抗する。これを利用して金属イオンとの反応性が高いもの(NOなど)のみが反応する分子の構築に成功した。これらを電極表面に修飾してデバイスの構築を試みたところ、金属イオンと電極表面との直接的な相互作用により、本来の分子の性質を電極上で再現することができなかった。

研究成果の概要(英文)：Suitable concentration of nitric oxide (NO) in human body, which is concerned with a release of blood vessel, immune response, and so on, depends on the roles of enzymes producing it. So, serious diseases such as hardness of the blood vessel and septicemia are caused by out of the concentration. In this study, we focused on the NO concentration in the body and tried to construct an NO sensing system. Metal ions whose formal positive charge is decreased by strong donation from coordination atoms are thought to refuse further electron supplement. This means that the metal ion can interact only with a highly reactive molecules. Modification of such a high NO reactive metal-containing molecule has been tried and characterized. The metal center did not showed a strict NO selectivity any longer, because the metal center directly interacts on the electrode surface.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・無機化学

キーワード：金属錯体化学 化学センサー

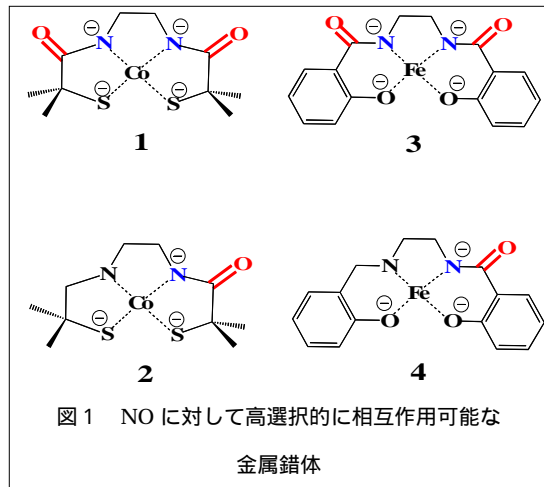
1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素分子は生体内において血管の弛緩作用、脳内情報伝達、免疫作用に關与する重要な小分子の1つである。近年よく耳にするメタボリック症候群では、活性酸素種の生成により血管内皮(ここでは NO 合成酵素が存在する。)の障害から NO の生成が阻害され動脈硬化を促進する。また血管内に外敵が侵入して敗血症となった場合には、短時間の血管弛緩に由来する急性ショックが生じ、直接生命にかかわる。こうした症状はそれぞれの作用において適した NO 濃度が異なっていることを示しており、濃度の正確な定量が健康状態を知る上で重要であると考えられる。

生体内 NO の検出のために EPR 法、蛍光法などが試みられてきたが、前者はその場観察が難しく後者は一般的にレスポンスが遅いあるいは分子のデバイス化が困難であるといった問題点があった。その一方で、高感度で微細加工が容易な電極を用い、主として酸化反応を利用した NO の検出手法についても多く研究されてきている。電極法は高感度で微細加工が比較的容易といった利点があるが、生体内に多く存在する NO の酸化体である NO₂⁻ イオンの酸化反応の影響を受けやすいといった大きな欠点もある。これに対応するためにはイオン交換膜などによる被覆が試みられているが、感度が減少する、均質な電極を作成し難いといった問題点も生じている。NO はラジカル分子であることから一般に生体内にある他の小分子等に比較して反応性が高く、特に電子移動可能な遷移金属イオンとの相互作用が強いことがよく知られている。そこで Malinski らをはじめ多くの研究者は、金属ポルフィリン、金属 salen といった種々の既存金属錯体を用いて修飾電極による NO の検出を試みてきた。しかし上記と同様 NO₂⁻ との反応性を示すことが選択性の大きな妨げになっており、現在でも実用化に至っていない。

2. 研究の目的

「1. 研究当初の背景」で述べたように、電極法は利便性・感度の点で非常に優れているにもかかわらず、選択性に対して大きな欠点がある。これは電極に触媒分子被覆を施しても改善されていない。このように NO 分子そのものに対する選択性を与えるためには既存の金属錯体では困難であると考え、本研究では NO の高い反応性を利用し反応性の低い分子が金属イオンと相互作用が困難になるよう、金属イオンの正味の正電荷を減少させる(ルイス酸性度を低下させる)ことを考えた。具体的には図1に示す新規金属錯体を構築した。配位子からの電子供与を大きくする(-4もしくは-3価)ことにより中心金属イオンの正電荷を小さくできる。これら錯体の NO 選択性の評価を行ったところ、すべての錯体において NO に対する高い選

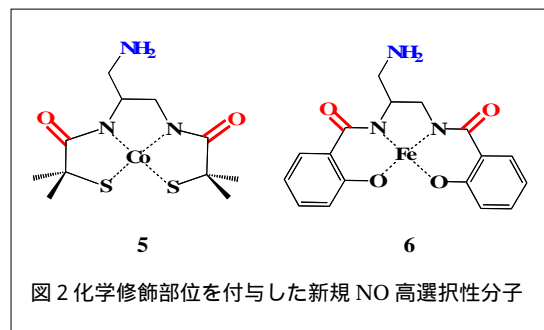


択性を有することが分かった。これら分子の選択性を生かすために、電極への修飾と電極の機能性について、均一系における分子の性質と比較検討した。

3. 研究の方法

図1に記した NO 高選択性を示す分子を電極表面に修飾することにより、NO 検出デバイス材料を構築する。これには分子を電極表面に吸着させる必要がある。分子の吸着方法として表面的な相互作用(ファンデルワールス相互作用など)や静電的な相互作用を利用した物理吸着法と分子と電極表面の間に化学結合を通じて固定化する化学吸着法があり、これらについて検討した。修飾した分子にはカルボニル基があり、赤外吸収において特徴的で大きな吸収を示すことから吸着した分子の状態の評価に用いた。吸着時の電気化学的応答については、サイクリックボルタムメトリーを用いた。

なお、化学吸着法では分子と電極表面に化学結合を通じて固定化させる必要があることから、分子構造を新たに構築した。より高い選択性を示したジアミド骨格を有する図1錯体1および3をベースにした分子の合成し、NO に対する反応性、選択性ならびに電気化学的応答について各種分工学的手法を用いて評価した。(図2参照)



4. 研究成果

研究成果については、1 物理吸着法を用いた電極修飾の評価、2 化学吸着可能な官能基を導入した金属錯体の構造・性質、ならびに

NO に対する反応性と選択性、³ 化学吸着法を用いた金電極表面修飾・評価について順次記載する。

1 錯体の物理吸着法による電極修飾

図 1 の中で NO に対する選択性、電気化学的応答性、安定性について比較的高く評価できた錯体 1 と 3 について物理吸着法を用いた電極の修飾を試みた。電極には評価しやすい金電極を用いた。よく似た挙動を示したので、代表的な錯体 1 を例にとり概要を説明する。

電極の作成はマイカ上に金を真空蒸着することにより生成する電極を水素炎アニールしたものを基盤電極とした。クロロホルム中に錯体 1 を溶解し、この基盤電極を数日間浸漬し、クロロホルム、アセトン、蒸留水の順で十分に洗浄した。このように調製された修飾電極を 0.1MNaClO₄ を含む超純水中に浸漬し、サイクリックボルタンメトリー測定を行った。その結果を図 3 に示す。錯体 1 の水溶液中におけるボルタモグラムは、-450 mV 付近に比較的可逆性が高い酸化還元挙動を示したのに対し、修飾電極では、-810 mV 付近へと低電位シフトし可逆性が失われていた。またこの還元電流は走引速度に対して直線的な関係で表されたことから、本系は電極に吸着した分子由来のボルタモグラムであることも分かった。低電位シフトは、電極表面の直接的な影響が現れていることを示唆する結果である。この電極表面の表面増強赤外吸収スペクトル(RAS)測定を行った。本測定の理論上、電極表面に対して垂直方向の吸収成分は増強されて観測されるはずであるが、全体的に強度が弱くなっていた。これは錯体 1 が電極表面に対して水平状態で固定化されていることを示している(図 4)。電極表面への被覆率を概算した。金属イオンの酸化還元反応で用いられた電流量から附着している分子の濃度が概算でき、用いた電極

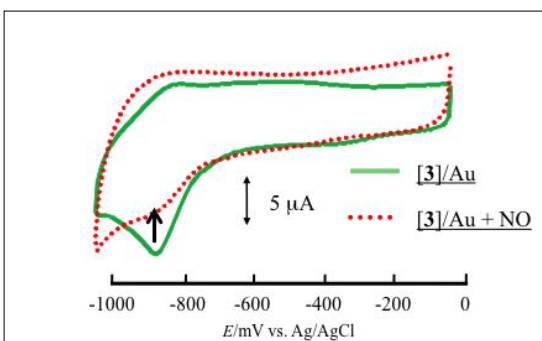


図 3 NO 添加前後におけるサイクリックボルタモグラム

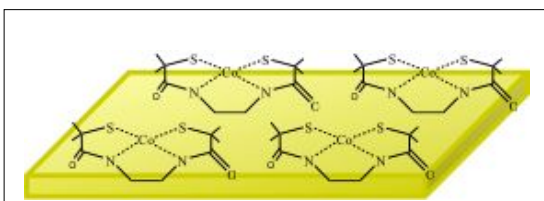


図 4 予想される金電極表面の物理吸着状態

の表面積と 1 つの錯体分子の直径をもとに得られたその投影面積を用いて表面積を見積もると、 $1.61 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ であった。この濃度は通常生体内で観測されると考えられている NO 濃度 (~数十 nM) に比べて極端に小さいことから、物理吸着法では生体内の NO センシングに適したデバイスの構築は困難であると結論づけられた。

ここに NO ガスを導入したところ、-850 mV 付近の還元波の強度が減少する挙動を示したが、図 4 に示した環境は均一条件下(溶液状態)での環境と大きく異なり比較が困難であったため、NO 検出デバイスを評価することができなかった。

2 化学吸着可能な官能基を導入した金属錯体の構造・性質、ならびに NO に対する反応性と選択性

1 でも述べた通り物理吸着法では、分子と電極表面との直接的な相互作用が予想されることから、化学吸着法を検討することにした。化学吸着法では電極表面との化学結合が必要となるため、分子自身に化学吸着可能な官能基を導入する必要がある。錯体 1, 3 の事前の性質検討から、これらアミノ基が金属錯体に対して配位しないことが十分に予想できたため、図 2 の錯体 5, 6 に示すアミノ基を新たに導入した機能性化合物の合成を実施した。

各種分光学的手法では、錯体 5, 6 はともに相当する錯体 1, 2 と同じ挙動が見られたことから、平面 4 配位構造を有していることが予想される。サイクリックボルタンメトリーを検討した結果でも同様、ほぼ同一の電位に可逆性の高い酸化還元挙動を示したことから、溶液中における挙動も錯体 1, 3 と同様の環境で生じていることが示唆された。

NO に対する反応性・選択性についても錯体 1, 2 と同様維持されていた。錯体 5 の場合の結果を図 5 に示す。

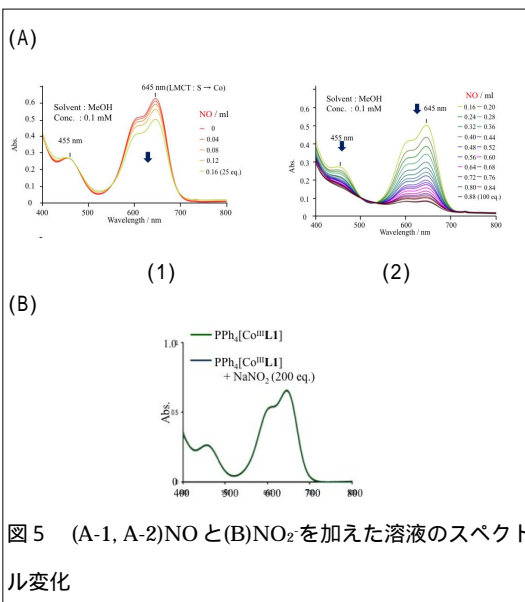


図 5 (A-1, A-2)NO と(B)NO₂ を加えた溶液のスペクトル変化

図 5 (B) から NO に対して高い選択性を保持

していることが分かる。また NO との反応性は、(A)から分かる通り 2 段階の変化が観測された。このような傾向は錯体 3 では見られなかったことから、含硫化合物に特徴的な挙動である。これらの NO の配位挙動を検討するため錯体 5 に対して 100 当量以上の NO ガスを入れたサンプルから得られた固体物質について赤外吸収スペクトルを測定した。そ

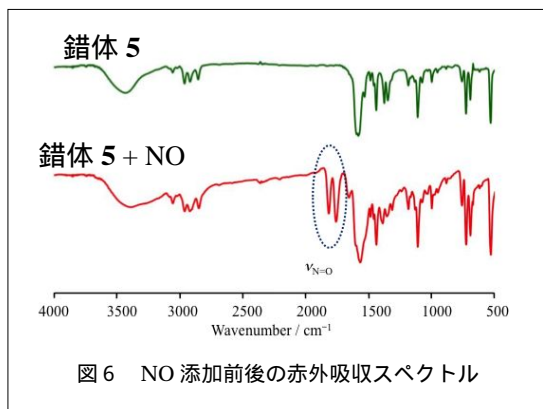


図 6 NO 添加前後の赤外吸収スペクトル

の結果を図 6 に示した。1700~1900 cm^{-1} 付近の領域に新しい吸収が 2 つ現れ、NO の伸縮振動領域であったことから金属イオンと配位結合した NO 分子由来の吸収であると帰属した。さらに 1600 cm^{-1} 付近にも小さいながら吸収が観測されている。これは NO が一つだけ配位結合した化学種由来の吸収であると帰属した。これらの値をいままでに報告されている Co-NO 錯体と比較したところ、1600 cm^{-1} 付近に吸収を示す化学種は Co^{II} もしくは Co^{III} 錯体に 1 つ NO が配位した構造に類似していると考えた。一方、1700 cm^{-1} 付近と 1800 cm^{-1} 付近に吸収をもつ化学種は $\text{Co}^{\text{I}}(\text{NO})_2$ 錯体由来であると考えた。すなわちここでは中心金属イオンが還元されているが、これは NO が一分子付加すると還元電位が正側にシフトし、フリーの NO による酸化が進行したためであると考えられる。これらの推定構造を図 7 に示す。

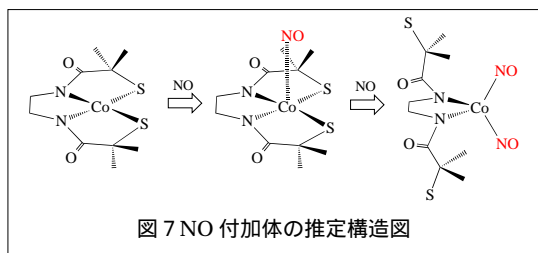


図 7 NO 付加体の推定構造図

3 化学吸着法を用いた金電極表面修飾・評価

金電極表面との化学吸着については、dithiobis(ethylcarboxylic acid)dihydroxy succinimide ester(DTSP)骨格をリンカーとして用い、アミド結合を経由して化学的に固定化した。以下化学修飾電極について錯体 6 を例にとり説明する。物理吸着法と同様の手法により調製した金電極を、DTSP が溶解した

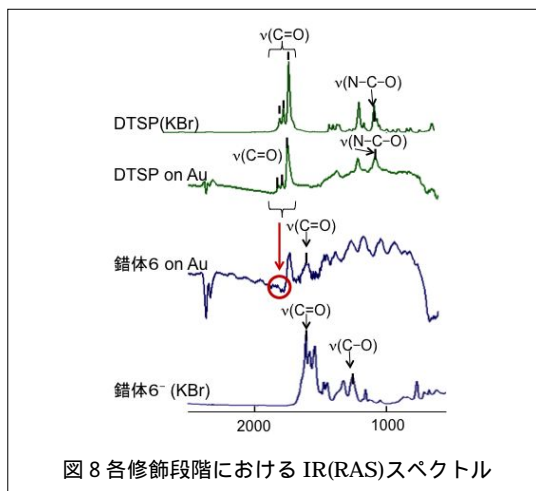


図 8 各修飾段階における IR(RAS)スペクトル

アセトン溶液に浸漬し、その後十分にアセトン洗浄した後に乾燥させた。この DTSP 修飾電極を錯体 6 が溶解した DMF 中に数日間浸漬することでアミド結合を形成させた。各種溶媒で十分に洗浄した後に、乾燥させ高感度反射型赤外吸収スペクトルの測定を行った。結果を図 8 に示す。DTSP 修飾金電極においてカルボニル伸縮振動に帰属される吸収強度の減少と錯体 6 由来のカルボニル伸縮振動があらたに確認できたことから、電極上に化学修飾で来たことが分かった。この電極を用いてサイクロボルタンメトリーを測定した NO 添加前には -0.8 付近に観測された $\text{Fe}^{\text{III/II}}$ に帰属される酸化還元電位が正側にシフトする挙動が見られた。

以上のように NO に対する反応性が電気化学的に検出されたことから、定電位における電流量の変化から NO 濃度の検出画可能であることが分かった。今回用いた化学修飾法は、物理吸着法よりも金電極表面への固定化に対して有効であり、利用可能であることが分かった。

一方、今回の電極表面への修飾は分子 1 層に限られているため、 $\sim 10^{-9}$ mol/cm² 程度の密度での修飾が限度となる。生体内の NO 濃度は $10^{-8} \sim 10^{-6}$ mol であると言われており、表面積を大きくした電極上に修飾するか、多重修飾が必要である。さらに本分子は NO の捕捉が可能であるが、測定条件下において脱離挙動を示さない。従って再利用を考えた場合には、可逆性などの機能を付与する設計が必要になる。

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)

1. Adsorption behavior of microbes on a QCM chip modified with an artificial siderophore- Fe^{3+} complex *Langmuir*, **28**, 1611-1617 (2012).
T. Inomata, H. Eguchi, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda

2. High selective binding of nitric oxide by Co^{III} and Fe^{III} complexes
Dalton Trans., **42**, 4470-4478 (2013).
Z. Zhang, T. Suwabe, M. Ishikawa, Y. Fuhnahashi, T. Inomata, T. Ozawa, H. Masuda
3. A ternary Ruthenium(II)-2,2':6',2''-terpyridine complex having intramolecular $\pi-\pi$ stacking interaction with ancillary benzyl groups of the mixed ligands
J. Chem. Chem. Eng., **6**, 363-367 (2012)
T. Aoki, Y. Wasada-Tsutsui, T. Inomata, T. Ozawa, Y. Funahashi, H. Masuda
4. A phosphonium-type ionic liquid-modified Au electrode: A new platform for entrapping functional molecules on substrate surface.
Chem. Commun., **49**, 10184-10186 (2013)
T. Kitagawa, T. Inomata, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda

[学会発表](計 14件)

1. Non-covalent modification of a Co(III) complex with high NO selectivity on Au electrode
International conference on Material for Advanced Technology 2011. Singapore
T. Ozawa, T. Kitagawa, T. Yano, Y. Funahashi, T. Inomata, H. Masuda
2. Characterization of Cobalt (III) complexes as a Functional Material for NO sensing and the Modification on Au electrode
International conference on Material for Advanced Technology 2011. Singapore
Z. Zhang, D. Tsurudome, T. Yano, Y. Wasada-Tsutsui, T. Inomata, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda
3. 電極修飾部位を有する NO 高選択型 N2O2-Fe 錯体合成と金表面への修飾
錯体化学会第 61 回討論会 岡山理科大学
石川舞・諏訪部達也・猪股智彦・船橋康博・小澤智宏・増田秀樹
4. Co-NO 結合二化する N2S2 配位環境についての理論的研究
第 5 回分子科学討論会 札幌コンベンションセンター
和佐田(筒井)裕子・張子正・橋本智裕・和佐田裕昭・猪股智彦・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹
5. NO 高選択性を示す Fe(III)錯体の構築
第 92 日本化学会春季年会 慶応大学
石川舞・矢野卓真・小澤智宏・増田秀樹
6. NO センシング材料を目指したアミダトチオラト型コバルト(III)錯体の合成と性質
第 92 日本化学会春季年会 慶応大学
水野嵩麗・矢野卓真・小澤智宏・増田秀樹
7. NO 高選択性を示す Fe(III)錯体の合成と金電極表面への修飾
錯体化学会第 62 回討論会 富山大学
石川舞・諏訪部達也・猪股智彦・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹
8. 非配位アミノ基を有するアミド-チオール型コバルト(III)錯体の合成と一酸化窒素との反応性
日本化学会第 93 春季年会 立命館大学
伊藤大展・猪股智彦・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹

9. Characterization and nitrile hydration reaction of a Ru complex with N₂S₃ donor sets similar to the active site structure of nitrile hydratase
7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Korea
T. Ozawa, T. Wada, T. Inomata, Y. Funahashi, H. Masuda
10. アミド-チオール型コバルト(III)錯体の合成と一酸化窒素との反応性
日本化学会第 93 春季年会 名古屋大学
伊藤大展・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹
11. NO センシングを目的としたコバルト(III)錯体の合成と小分子との反応性
日本化学会第 93 春季年会 名古屋大学
木本雄也・猪股智彦・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹
12. アミド-チオール型錯体による高選択性 NO センシング材料の開発
錯体化学会第 63 回討論会 琉球大学
伊藤大展・猪股智彦・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹
13. チオカルボン酸を有する光学活性コバルト(III)錯体の合成と多核化反応
錯体化学会第 63 回討論会 琉球大学
中島美波・松本健司・小澤智宏・米村俊昭
14. NO 反応性を有する金属錯体の構築と選択性の検討
第 3 回 CSJ 化学フェスタ 2013 タワーホール船堀
木本雄也・猪股智彦・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

[その他]
ホームページ：
<http://www.ach.nitech.ac.jp/~inorg/masuda/Japanese/Research/index.html>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
(小澤智宏)
研究者番号：70270999
- (2) 研究分担者
(米村俊昭)
研究者番号：90240382