

B-14 銅イオン (II) に対し高い発光効率を示す 3, 5位置換BODIPY蛍光指示薬

○羽深 昭^{1*}・大屋 光平²・瀧谷 明義²・山田 幸司³・岡部 聡²・佐藤 久²

¹中央大学理工学部人間総合理工学科 (〒112-8551東京都文京区春日1-13-27)

²北海道大学大学院工学院環境創生工学専攻 (〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目)

³北海道大学大学院地球環境科学研究院環境物質科学専攻 (〒060-0810北海道札幌市北区北10条西5丁目)

* E-mail: hafuka.14p@g.chuo-u.ac.jp

1. はじめに

重金属は水環境や水資源中の代表的な汚染物質であり、その毒性により人の健康および生態系に対して深刻な被害を引き起こす。例えば銅イオン (II) (Cu^{2+}) は Fe^{3+} 、 Zn^{2+} に次いで3番目に多く人体中に含まれる必須遷移金属イオンであるが、過剰量存在するとウィルソン病などの神経変性疾患の原因となる。したがって、人為的な重金属汚染を防ぐために含重金属廃水の適切な管理と処理が必要である。そこで、現場においては重金属の簡易分析が行われる。

代表的な重金属の簡易分析法として吸光光度法と比色法が挙げられる。これら分析法の長所は (1) 迅速な分析、(2) 安価な費用、である。しかしながら感度が低く、共存金属の妨害影響も大きいことが課題である。一方、同様の光学的分析法に蛍光分光法がある。蛍光分光法の長所は、迅速な分析、安価な費用に加え、吸光光度

法に比べて高感度な点である。これは吸光光度法が入射光と透過光とのわずかな差を検出するのに対し、蛍光分光法では光のない状態をバックグラウンドとし、蛍光発光の増加分を検出するためである。

本研究ではこれまでに Zn^{2+} と Cr^{3+} を定量可能な蛍光指示薬を開発し、環境試料の分析へ応用してきた¹⁻³。しかしながらこれら蛍光指示薬は、 Cu^{2+} により蛍光消光するという問題点があった。これは本研究に限らず多くの蛍光指示薬で報告されている現象であり、銅の常磁性により蛍光指示薬とのエネルギー移動や電子移動が起こるためである。そこで本研究では蛍光指示薬に異なる種類の置換基を導入することで、 Cu^{2+} による消光作用を抑制することを試みた。

2. 実験方法

(1) 蛍光指示薬の設計

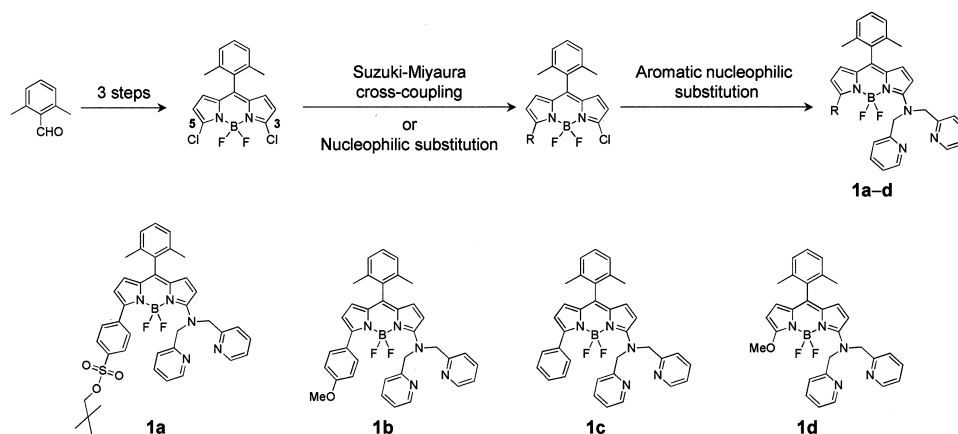


図 1. 新規蛍光指示薬 1a-d の分子構造および合成スキーム (a: $\text{R} = p\text{-Ph-SO}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, b: $\text{R} = p\text{-Ph-OMe}$, c: $\text{R} = p\text{-Ph}$, d: $\text{R} = \text{OMe}$) .

蛍光指示薬は低分子有機化合物であり、重金属イオンに応答し蛍光特性（蛍光強度、蛍光波長、蛍光量子収率など）を変化させる機能を有する。蛍光指示薬は蛍光色素母骨格とイオン認識部位で構成される。

イオンを認識した際、蛍光指示薬の蛍光スペクトル応答は、(1) 蛍光発光、(2) 蛍光消光、(3) 蛍光波長シフトの3種類がある。この中でも蛍光波長シフトを示す蛍光指示薬が最も定量性が高い。これはイオン濃度をレシオメトリック測定することが可能なためである。レシオメトリック測定とは異なる2波長での蛍光強度を測定し、その強度比を用いて目的物質の定量を行う方法である。蛍光強度比は蛍光指示薬濃度、蛍光退色、励起光強度および機器感度に依存しない。そのため単一波長での蛍光強度測定に比べて、レシオメトリック測定は測定誤差が小さく定量性が高い。

そこで本研究では蛍光波長シフトを示す蛍光指示薬を開発するため、蛍光色素母骨格として BODIPY (Boron-dipyrromethene, 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) を用いて研究を行ってきた。BODIPY は、(1) 高いモル吸光係数、(2) 高い蛍光量子収率、(3) バンド幅の狭く鋭いスペクトル、(4) 高い光化学安定性、(5) 500 nm 以上の可視光域に吸収および蛍光極大を示す、などの優れた光物性をもつことが知られている。また、わずかな置換基変更により、その蛍光特性が大きく変化することが最大の特徴である。特に 3, 5 位に電子密度の異なる置換基を導入することで、吸収および蛍光スペクトルがシフトすることが報告されている。すなわち BODIPY の 3 位（または 5 位）にイオン認識部位を導入すると、イオン認識前後で BODIPY の 3 位（または 5 位）の電子密度が変化し、蛍光波長シフトが起こる。

本研究では、重金属イオン認識部位に Dipicolylamine (Bis(pyridin-2-ylmethyl) amine) を選定し、BODIPY の 3 位に導入した。Dipicolylamine は特に Cu^{2+} や Zn^{2+} に親和性が高いことが報告されている。さらに本研究では Cu^{2+} の消光効果抑制に対する BODIPY 5 位の置換基効果を明らかにするため、電子密度の異なる 4 種類の置換基を導入した。本研究で設計した新規蛍光指示薬 4 種類の分子構造

とその合成スキームを図 1 に示す。

(2) 蛍光指示薬の合成

試薬は市販のものを精製せずに使用した。高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC; silica gel 60 F₂₅₄, Merck) または薄層クロマトグラフィー (TLC; aluminum oxide 60 F₂₅₄, basic, Merck) を用い反応のモニタリングを行った。UV ライト、またはアニスアルデヒド溶液による染色と加熱により TLC プレートを目視化した。カラムクロマトグラフィーにはシリカゲル 60 (230–400 mesh) または塩基性酸化アルミニウム 90 を用いた。合成した化合物を同定するため、JEOL 400 核磁気共鳴装置 (400 MHz ^1H ; 100 MHz ^{13}C) を用いて、 ^1H および ^{13}C -NMR スペクトル測定した。また、Thermo Scientific Exactive 分光計または JEOL JMS-T100LP 分光計を用いて ESI 高分解能質量分析 (ESI-HRMS) を行った。

(3) 蛍光指示薬の特性評価

蛍光指示薬を分光分析用アセトニトリルに溶かし標準液を調製した。同様に、金属過塩素酸塩をアセトニトリルに溶かし、金属イオン標準液を調製した。10 mL メスフラスコ中に蛍光指示薬標準液、金属イオン標準液を適切な量加えた後、メスアップし各種分析試料を調製した。調製した分析試料を石英セル（横断面 1 cm × 1 cm）に入れ、蛍光分光光度計（日本分光、JASCO FP-6600）および紫外可視分光光度計（日本分光、JASCO V-630）を用いて蛍光および吸収スペクトル測定を行った。励起光および蛍光のスリット幅はそれぞれ 5.0 nm および 6.0 nm とした。蛍光指示薬のみを含むブランク溶液 11 試料の蛍光および吸収スペクトル測定の結果から得られた標準偏差 (σ) から検出限界 ($3\sigma/\text{slope}$) を算出した。また、ローダミン 6G 水溶液（蛍光量子収率 (Φ) は 0.76）を標準物質とし分析試料溶液の蛍光スペクトルと比較することで蛍光量子収率を求めた。

3. 結果と考察

本合成スキームでは鈴木-宮浦クロスカップリング反

表 1. Cu^{2+} 添加 (200 μM) 前後における蛍光指示薬 1a-d (2 μM) の吸収極大波長 (λ_{abs})、蛍光極大波長 (λ_{fl})、モル吸光係数 (ϵ) および蛍光量子収率 (Φ)。

蛍光指示薬	Cu^{2+} 添加前				Cu^{2+} 添加後			
	$\lambda_{\text{abs}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{fl}}(\text{nm})$	$\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	Φ	$\lambda_{\text{abs}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{fl}}(\text{nm})$	$\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	Φ
1a	502	581	28000	0.63	590	620	47000	0.28
1b	524	599	27000	0.58	604	647	38000	0.03
1c	509	582	30000	0.62	588	619	42000	0.16
1d	534	560	18000	0.63	504	535	8000	0.23

応および芳香族求核置換反応を活用し、4種類の新規蛍光指示薬の合成に成功した(図1)。表1に Cu^{2+} 添加(100 eq, 200 μM)前後の蛍光指示薬の光物性を示す。全ての蛍光指示薬が Cu^{2+} に応答し、吸収極大波長および蛍光極大波長がシフトした。蛍光指示薬**1b**が最も大きな蛍光波長シフト(48 nm)を示したが、蛍光量子収率は0.03と低く、 Cu^{2+} による蛍光消光が顕著であった。一方、蛍光指示薬**1a**は Cu^{2+} 添加後も0.28と高い蛍光量子収率を示し、モル吸光係数 ϵ も47000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ と最も高い値を示した。蛍光指示薬**1a**はBODIPYの5位に電子吸引基であるスルホニルフェニル基を置換しており、電子吸引基による効果であることが示唆された。

開発した蛍光指示薬の中で、**1a**が Cu^{2+} に対し最も高いモル吸光係数および蛍光量子収率を示したため、指示薬**1a**を用いて Cu^{2+} との蛍光滴定実験を行った(図2)。 Cu^{2+} 濃度が上昇するにつれ、蛍光指示薬由来の581 nmでの蛍光強度(F_{581})が減少し、 Cu^{2+} 錯体由来の620 nmでの蛍光強度(F_{620})が増加した。このように蛍光指示薬**1a**は Cu^{2+} 濃度増加に対し、レシオメトリック型の蛍光スペクトル変化を示した。 Cu^{2+} の検出限界は 3.2×10^{-7} Mであり、解離定数(K_d)は 3.8×10^{-6} Mであった。

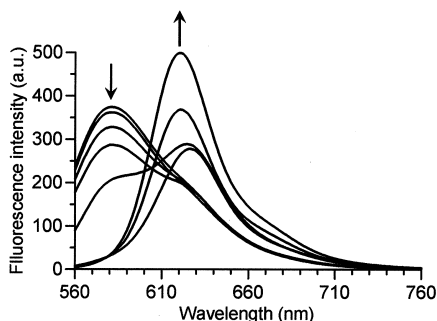


図 2. Cu^{2+} 濃度増加(0–10 μM)による蛍光指示薬**1a**の蛍光スペクトル変化。励起波長 550 nm。

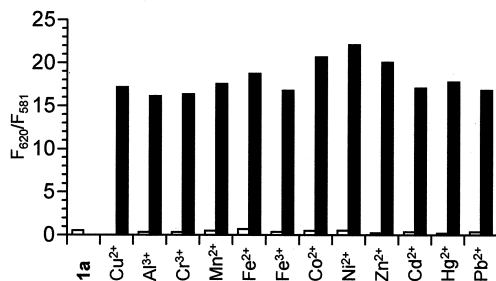


図 3. 各金属イオンによる指示薬**1a**の蛍光強度比シグナル(F_{620}/F_{581})変化(金属イオン濃度: 10 μM , 白色: 単一の金属イオンのみを含む試料, 黒: 同様の試料にさらに Cu^{2+} を添加した試料)。

つづいて、蛍光指示薬**1a**の Cu^{2+} 選択性試験を行った(図3)。指示薬**1a**は Na^+ , K^+ のアルカリ金属イオン、 Mg^{2+} , Ca^{2+} といったアルカリ土類金属イオンには応答しなかった。また、その他の金属イオンを加えても蛍光強度比シグナル(F_{620}/F_{581})は増加せず、 Cu^{2+} が共存する場合のみシグナルが増加した。この時の蛍光強度比シグナルは Cu^{2+} のみを含む試料のシグナル(およそ18.0)と同等であり、蛍光スペクトルも Cu^{2+} 錯体由来のものと一致した。この結果から蛍光指示薬**1a**は Cu^{2+} に選択性が高いことが明らかとなった。

4. 結論

本研究では鈴木-宮浦クロスカップリング反応および芳香族求核置換反応を利用し、4種類の新規蛍光指示薬を開発した。これら蛍光指示薬のイオン認識部位はDipicolylamineで全て共通であるが、5位にはそれぞれ異なる電子密度の置換基を導入した。蛍光指示薬の Cu^{2+} への応答を比較した結果、スルホニルフェニル基を置換した指示薬**1a**が最も高いモル吸光係数および蛍光量子収率を示した。すなわち、蛍光指示薬**1a**は強い蛍光消光作用性を有する Cu^{2+} に対しても高い発光効率を示し、5位に導入した電子吸引基による効果であることが示唆された。蛍光指示薬**1a**を用いて Cu^{2+} との蛍光滴定実験を行った結果、指示薬**1a**は期待した通り、レシオメトリック型の蛍光スペクトル変化を示した。さらに他の金属イオンとの競合実験を行った結果、指示薬**1a**は Cu^{2+} に対し高い選択性を有することが明らかとなった。

謝辞

本研究はJSPS科研費12J01817, 23686074, 26289178の助成を受けたものです。

参考文献

1. A. Hafuka *et al.*, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **86**(1), pp37–44, 2013.
2. 羽深昭ら, 土木学会論文集 G (環境), **69**(7), III_275–279, 2013.
3. A. Hafuka *et al.*, *Water Research*, **54**, pp12–20, 2014.