HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	分子内電荷移動の制御による蛍光化学センサーの展開
Author(s)	岡, 佳和; 諸角, 達也; 中村, 博
Citation	分析化学, 61(3), 145-156 https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.61.145
Issue Date	2012-03-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49140
Type	journal article
File Information	BK61-3_145-156.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

BUNSEKI KAGAKU Vol. 61, No. 3, pp. 145–156（2012）

© 2012 The Japan Society for Analytical Chemistry

総合論文*

分子内電荷移動の制御による蛍光化学センサーの展開

岡　佳和[1]，諸角　達也[2]，中村　博®[2]

分析試薬は可視化によって化学種やその濃度のような実験系の状態を把握する機能を有する．検出対象物質に対する感度及び選択性が分析試薬の開発において強く求められている．このような条件を満たすために，当研究室ではねじれ型分子内電荷移動（TICT）機構を用いた蛍光化学センサーを開発してきた．本論文では，*N*-phenyl-9-anthacenecarboxamide（9-AA）を基本骨格としたTICT機構と，その展開としてアルカリ土類金属または界面活性剤を検出するための9-AA誘導体について報告する．

1　緒　　言

紫外・可視光を検出手段とする試薬は環境分析，金属イオン，界面活性剤などの有機化合物及び生体分子を対象とし，幅広く研究開発されている[1)]．現在，分析機器といえば高速液体クロマトグラフィー（HPLC），ガスクロマトグラフィー（GC），ICP，質量分析（MS），NMRなどが挙げられ，これらの機器からは多くの情報が得られている．しかしながら，これらの機器の購入や運用には多くのコストやメンテナンスを必要とし，また装置も大型になるため屋内での使用に限定される．一方，着色，発色を観測する比色検出試薬では取り扱いが容易であり，また小型化も可能である．既にコンパクトにキット化されたものが幾つも販売されている．この様な比色試薬は，実験操作の短縮，省コスト，省スペース化，また屋外での使用が可能となるため，フィールドワークにおいてその場（*in situ*）での分析が可能となり得る．特に，迅速な対応が求められる化学物質の流出事故等に対しては大きな期待が持たれる．

分析試薬は対象物質に対する検出器のような振る舞いを見せるため，化学センサー，光学プローブなどの用語で呼ばれることが多い[2)]．化学センサーの構造は単一化合物あるいは複合体で構成され，機能的にはターゲット分子（検出対象物質）を捕捉し錯体を形成する認識部位，捕捉した事を知らせる色素部位，そしてこの両者をつなぎ止めるリンカー（またはスペーサーという）部位に分かれる．認識部位は対象物質に応じてクラウンエーテル，ポリオキシエチレン，カリックスアレーン，シクロデキストリンなどの大分子が用いられている．色素部位はアントラセンやピレンなどの多環芳香族，クマリンなどのヘテロ環芳香族，アゾ化合物，鈴木–宮浦クロスカップリングによる新規合成色素など豊富に存在する．リンカーは認識部位と色素をカップリング合成する際に生じる部位であり，エステル，エーテル，アミドなどが一例に挙げられる．リンカーは蛍光スペクトル挙動，ターゲット分子に対する選択性など機能性に影響を与えるため，化学センサーの機能向上の着目点になる場合がある．化学センサーは種類に非常に富んでおりこれらはほんの一例である．

クラウンエーテル型のアルカリ金属検出試薬は，1977年に高木らが世界で初めて開発した比色抽出試薬（Fig. 1）であり，benzo-15-crown-5部位にプロトン解離性の発色団を導入している[3)]．pHが約11のカリウム含有水溶液をこの比色試薬を含むクロロホルム溶液で抽出すると，有機層はオレンジ色から深赤色へと変化する．このように，色の変化を用いる事でカリウムイオンの存在を定性的に視認することが出来る．さらに吸収スペクトルを測定することでより詳細に，すなわち定量的な分析が可能となる．この試薬を用いた場合，10～800 ppmの範囲で定量可能である．また，リチウム，ナトリウム，マグネシウム，カルシウムイオンは，2000 ppm以上共存しない限り妨害しない．この

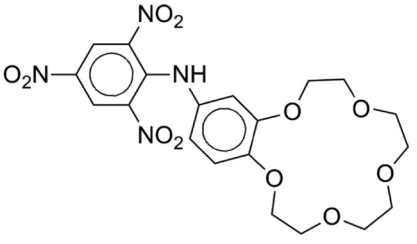


Fig. 1　Structure of the initial colorimetric chemosensor

* 故 高木　誠教授追悼論文
® E-mail : nakamura@ees.hokudai.ac.jp
[1] 北海道大学大学院環境科学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
[2] 北海道大学大学院地球環境科学研究院物質機能科学部門 : 060-0810　北海道札幌市北区北10条西5丁目

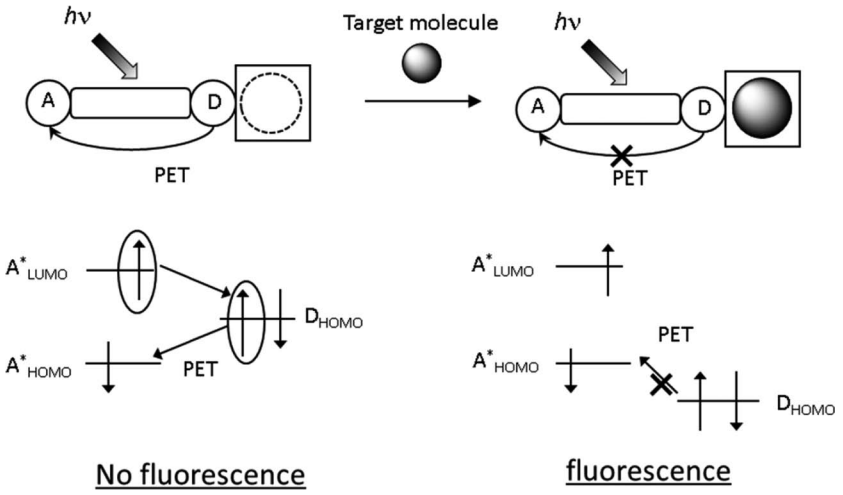


Fig. 2 Mechanism of photoinduced electron transfer (PET)

研究を出発点として，多くの研究室でクラウンエーテル型分析試薬が開発されている[4]．

一方，蛍光光度法は吸光光度法に比べ感度が約 1000 倍高い事から，最近では蛍光化学センサーの研究が盛んに行われている．蛍光化学センサーは，蛍光色素部位とターゲット分子を取り込む認識部位より構成され，吸光度（比色）型と類似している．そして，ターゲット分子と錯体を形成する際に蛍光スペクトルが変化し，吸光度型と同様に定量が可能となる．蛍光強度が変化する蛍光化学センサーには，錯体形成する事で蛍光強度が弱い（Off 状態）から強い（On 状態）へと変化する“Off-On”型と，逆に錯体形成時に発光が減少する“On-Off”型が存在する．

以上のように蛍光強度が変化する理由は，蛍光化学センサーの励起状態に存在する消光過程にある．蛍光スペクトルが変化する要素として，吸収スペクトルに起因する場合がある．化合物が受ける光子の量に応じて排出（発光）する光子数も変化するというものである．しかし，これから述べる消光過程は発光の増減は，励起分子の発光過程に影響を与える．光照射によって励起された分子は基底状態に戻る（緩和する）際に，光を発する蛍光発光過程か熱失活による無輻射過程のいずれか経る．後者の無輻射過程は分子内または分子間の相互作用による消光過程によって増大される．“Off-On”型センサーにおいてターゲット分子と錯体を作る事で蛍光が強く発光するのは，フリーの状態で作用していた消光過程が錯体の形成により抑制されるためである．著者らは，消光過程として光誘起電子移動（photo-induced electron transfer：PET）及びねじれ型分子内電荷移動（twisted intramolecular charge transfer：TICT）を用いた蛍光化学センサーを開発してきた．PET や TICT のような機構は，錯形成前後で異なる励起種の緩和過程を作り出す．緩和過程の速度が異なると蛍光発光強度も変化する．ただし，PET や TICT は消光の十分条件ではなく，必ずしも消光に至るとは限らない点に注意する必要がある．次にこれら二つの機構について述べる．

PET は光励起状態での分子内または分子間で起こる酸化還元反応である．PET に基づく蛍光化学センサーはこれまでに数多く開発されており，著者らもそれらのいくつかを報告している[5)~7)]．Fig. 2 に蛍光化学センサーにおける PET の一例を示す．共有結合で結ばれた A が光照射により励起されると，電子は LUMO に遷移する．すると，空いた HOMO に D から電子の移動が起こり，分子内で電荷の分離が起こる．続いてすぐに LUMO の電子は空いた D の HOMO に移動する事で基底状態に戻るという一連の流れが生じる．ここに，ターゲット分子の配位などで酸化還元準位が変化し，D 側の酸化還元電位が A 側の HOMO より低下すると PET は抑制される．PET はイオン性のターゲット分子と錯体形成により酸化還元電位が変化し，同時に蛍光発光挙動が変化する．これに対し，以下に述べるように TICT は分子内の立体構造の変化を利用している．そのため，電気的に中性の有機分子に対しても蛍光化学センサーの開発が可能となる．

TICT は 4-dimethylaminobenzonitrile（DMABN）の蛍光が溶媒極性の増大した場合蛍光スペクトルが長波長側へとシフトする理由を説明するために，Rotkiewicz らによって提唱された理論である[8)]．基底状態では DMABN は平面構造をとっている（Fig. 3）．溶媒の極性が低い場合，光照射で励起すると，それよりもやや長い波長の光（蛍光）を放出して基底状態へと至る．しかし，極性の大きな溶媒中では長波長の蛍光が観測される．これは極性が大きいと，光励起状態でジメチルアミノ基上の窒素電子がベンゼン環へと移動し，ねじれ型分子内電荷分離（TICT）構造をとるためとされている．この 90° にねじれた構造では，分子全体の共役が切れ π 電子は局在化している．そして，この構造を維持した状態から長波長シフトした蛍光を発する．光の

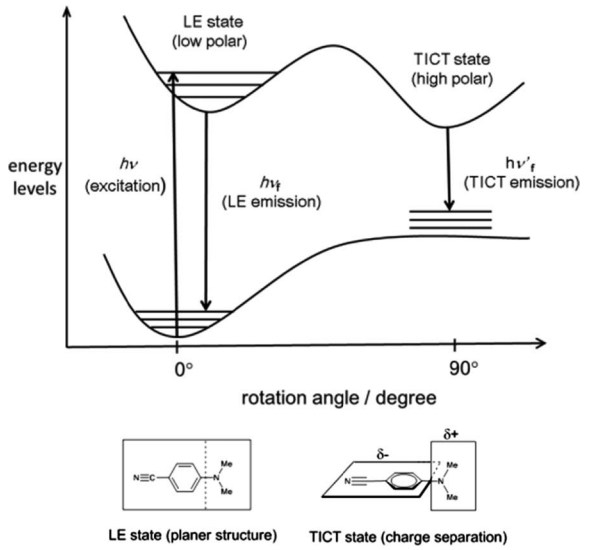


Fig. 3　Mechanism of twisted intramolecular charge transfer for DMABN

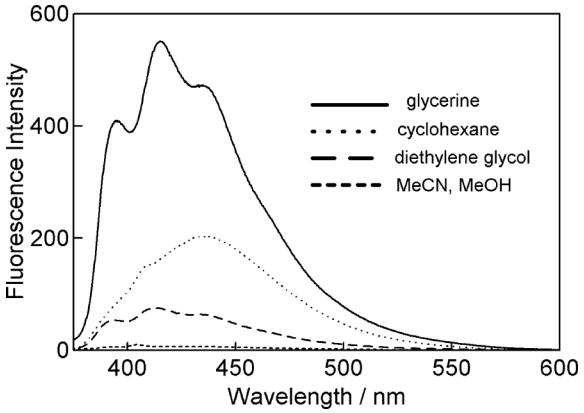


Fig. 4　Fluorescence spectra of 9-AA in various solvents at 25 ℃
Excitation wavelength : 362 nm.　[9-AA] = 1×10^{-5} M.

吸収・発光で起こる電子遷移の速度は 10^{-16} s 以内であり幾何構造変化のそれ（10^{-14}～10^{-12} s 程度）に比べ非常に速く，分子の構造はねじれ構造を維持したままである（Frank-Condon の原理）．重要なのは，電荷分離を生じるために溶媒依存性がある事，また一般に基底状態においてはねじれた構造はその平面構造よりもエネルギーが高いため，蛍光波長は平面構造の場合と比べて長くなる（$\nu_f < \nu_f'$）と言う点である（Fig. 3）．

DMABN は平面と垂直の 2 つの構造をとるのに対し，*N*-methyl 基を平面に固定した 5-cyano-*N*-methylindoline は，*N*-methyl 基が平面に固定されているため短波長側の蛍光のみが現れる．一方，*N*-methyl 基を垂直に固定した型の 6-cyanobenzquinuclidine では長波長側の蛍光のみを示す[9]．このような結果は，DMABN が蛍光波長の違いが分子内のねじれ構造にある事を示している．同様の実験結果は他の研究者よりも報告されており，これらは TICT 機構を支持している[10)11)]．

分子立体構造の安定性は周りに存在する溶媒の寄与を受けるため，TICT による電荷分離状態の生成に関して粘性の効果も検討されている．グリセリンなどの高粘性溶媒では励起状態における分子内の回転が粘性の増大によって抑制されると考えられている．Sahaa らは化合物を用いて蛍光発光と粘性の関係を定量的な評価を行い，蛍光量子収率が粘性の増大に伴って指数関数的に単調増加するという結果を得た[12]．以上のように，TICT に基づく蛍光の挙動は溶媒の極性と粘性に大きな影響を受ける．このことは，新規合成系が TICT 性を示すかどうかを調べる上で大きな手がかりとなる．

本論文では，*N*-phenyl-9-anthracenecarboxamide（9-AA）の TICT 挙動について検討し，アルカリ土類金属イオンをターゲットとしたポリオキシエチレン型及び，界面活性剤をターゲットとしたシクロデキストリン型の蛍光“Off-On”化学センサーを報告する．実験は紫外 - 可視吸光光度（UV-vis），蛍光スペクトルを測定した後，NMR にて錯体形成挙動を調べ，ターゲット分子の選択性について議論する．なおスペースの都合上，スペクトルデータは代表例のみを示し残りは割愛した．

2　実　　験

化学センサー（**2**～**8**）及びモデル化合物 9-AA(**1**)，M1～M3 を新規合成し，^{1}H NMR（JEOL，JNM-EX-400），元素分析で同定した．ポリオキシエチレン型化学センサーはアセトニトリルに溶解し 1×10^{-5} M のサンプル溶液を調製した．シクロデキストリン型は脱イオン水に溶解して 5×10^{-6} M の濃度に調製した．アルカリ土類金属は過塩素酸塩を 250 ℃ で 5 時間真空乾燥し，アセトニトリル溶液とした．UV-vis（Shimadzu, UV-2400PC），蛍光（Shimadzu, RF-5300）測定は 25 ℃ で行い，また有機溶媒にはスペクトルゾール（同仁化学製）を用いた．NMR 測定は重アセトニトリル及び重水溶媒を用い，30 ℃ で行った．

3　結果と考察

3･1　*N*-Phenyl-9-anthracenecarboxamido の蛍光発光挙動[13)]

TICT による消光効率は，溶媒の性質（粘性，極性）に大きく影響を受ける事が知られている．Fig. 4 に種々の溶媒における 9-AA の蛍光スペクトルを示す．アセトニトリル（η = 0.375 mPa s, ε_r = 36.00,）及びメタノール（η = 0.555 mPa s, ε = 32.45）中では，発光強度は非常に弱い．これに対し，グリセリン（η = 945 mPa s, ε_r = 42.5）中では蛍光強度が劇的に増大し，アントラセン発光の特徴を示す

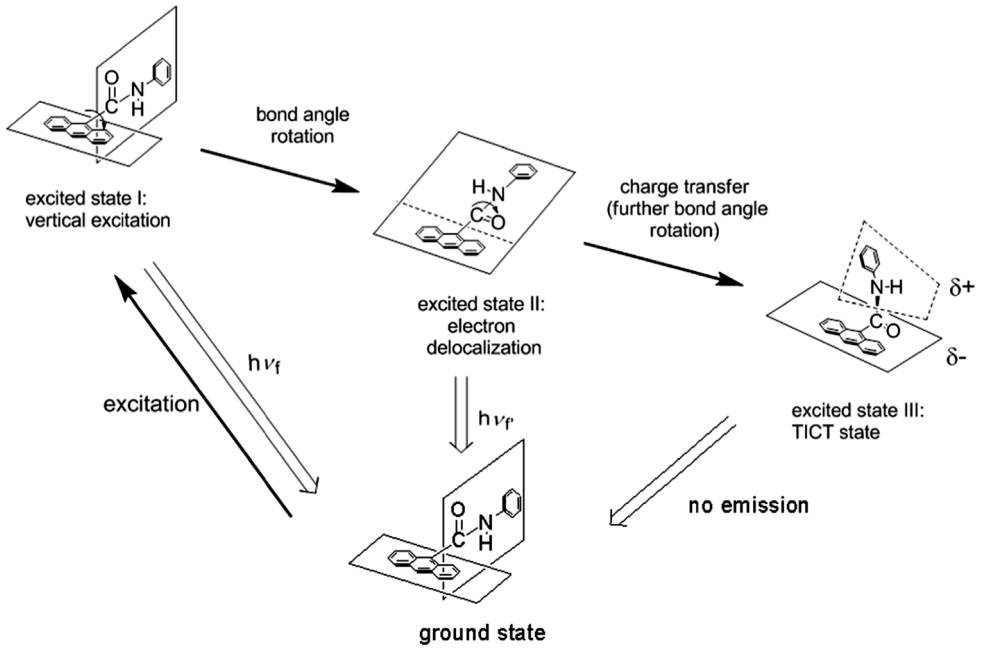


Fig. 5 Schematic representation of the mechanism for the relxation process of photoexcited 9-AA in solvents

3 本のピークが観測された．また，ジエチレングリコール（ε_r = 31.69）中では蛍光強度は弱いが，同様のピークが得られた．さらにシクロヘキサン（η = 0.898 mPa s, ε_r = 2.02）溶液中では，蛍光強度はグリセリンの半分程度であるがスペクトルの形状が単一のピークの形状をとった．蛍光強度に着目すると，測定した溶媒の間では低極性かつ低粘性の溶媒中では蛍光は弱く，高極性，高粘度の溶媒では強い蛍光発光が得られるという結果となった．

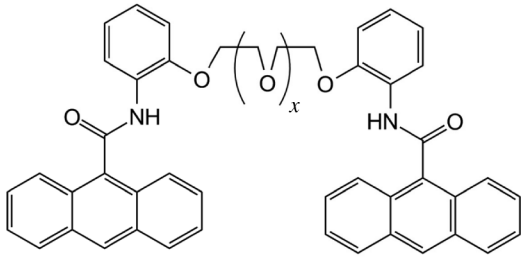
次に，蛍光スペクトルの形状に焦点を当て検討を行った．9-anthracenecarboxylic acid（9-COOH）はスペクトルの形状が溶媒によってブロードまたは非構造的になり，そして異常に大きな Stokes シフトを伴う事が知られている[14)~18)]．この振る舞いについて，Agbaria らは励起状態においてアントラセン環とカルボキシル基の平面化を伴う電荷移動に起因すると指摘している[18)]．また Azumaya らは，benzanilide と *N*-methylbenzanilide の二重蛍光性がアミド結合のねじれを伴う TICT によるものと結論づけている[19)]．

これら二点，励起状態における芳香環・置換基間の平面化とアミド結合の回転に基づいた 9-AA の励起，緩和過程を Fig. 5 に示す．まず，基底状態ではアントラセン環平面とアミド平面は同一面にはなく直交している（アントラセン環の水素原子とカルボニル基の間で立体障害が発生しているため）．光照射を行いアントラセン環が励起されると，Frank-Condon の原理により立体構造を維持したまま垂直励起状態（excited state I）に至る．高粘度のグリセリン溶媒を使用した場合のように，分子回転が抑制されると TICT が起こらず通常の蛍光を出して基底状態へと戻る．このとき，アントラセン環とアミド部位は直交しているために相互作用はなく，スペクトルの形状は無置換の 9-アントラセンと類似する．一方低粘性の溶媒では，excited state I からの両者間の結合軌道の回転が起こり，二つの面が同一となり，新たな共役系が出来る（excited state II）．低粘性のシクロヘキサン中ではグリセリンやジエチレングリコール中と異なり，π 電子が伸張を示すスペクトルのブロード化とピークの長波長側へのシフトが観測された．しかしながら，低粘性・高極性のメタノール，アセトニトリル中では蛍光は発せず消光した．この結果はこれまでは異なる新たな励起状態が発生していることを明確に示している．溶媒の極性で蛍光挙動が異なっている事，そして Werner らと Azumaya らの研究を踏まえると，第 3 の励起状態は，excited state II で生じた共役系の中のためにアントラセン環とアミド部位間で電荷分離を起こしていると考えられる．そして，系の電子状態の変化は同時に立体構造の変化を意味しており，C–N 結合間がねじれた電荷分離状態をとっている可能性がある．excited state III の 9-AA が消光している理由は（1）C–N を境とした PET による電荷分離状態の生成（2）C–N 結合が共役系としての役割を失い，これにより生成したアミンが消光剤として振る舞う．など光誘起電子移動に類する消光が起こっている可能性がある．また，シクロヘキサン中では電荷分離状態に移行しないのは溶媒の低極性に起因すると思われる．

3･2 ポリオキシエチレン修飾 TICT センサー

3･2･1 対称型ポリオキシエチレン TICT センサー

ポリオキシエチレンの両末端に 9-AA を導入した，3 つの誘



2: x=2
3: x=3
4: x=4

Fig. 6　Chemical structures of **2**–**4**

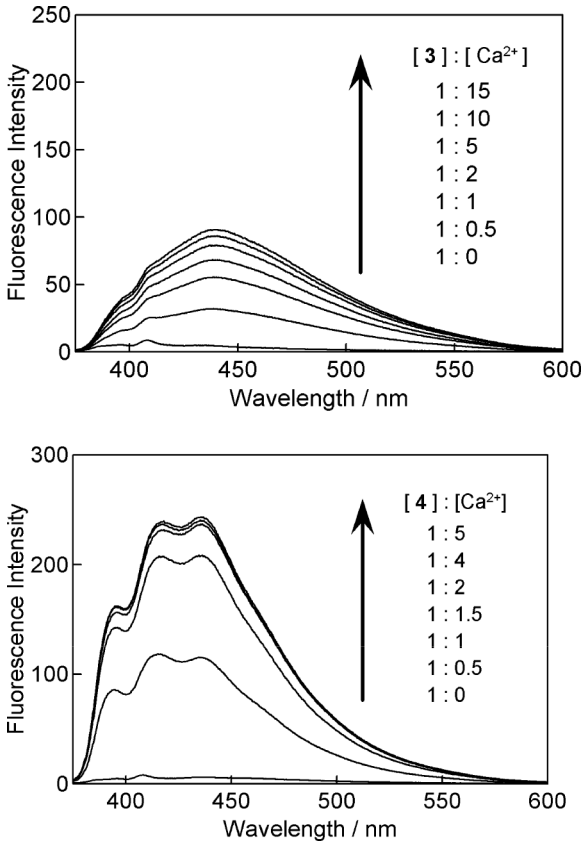


Fig. 7　Fluorescence spectra of **3** and its Ca^{2+} complex and **4** and its Ca^{2+} complex in MeCN at 25 ℃
Excitation wavelength 362 nm ; [**3**], [**4**] = 1×10^{-5} M.

導体 *N*,*N*'-[Ethylenedioxybis(ethyleneoxy)-2-phenyl]bis(9-anthracenecarboxamide)(**2**)，*N*,*N*'-[Oxybis(3-oxapentamethyleneoxy)-2-phenyl]bis(9-anthracenecarboxamide)(**3**), *N*,*N*'-[Ethylenedioxybis(3-oxapentamethyleneoxy)-2-phenyl]-bis(9-anthracenecarboxamide) (**4**) を合成した[13]．化合物の構造式を Fig. 6 に示す．それぞれ 1×10^{-5} M アセトニトリル中における蛍光スペクトルを測定した．例として，Ca^{2+}不在下及び存在下における **3**～**4** の蛍光スペクトルを Fig. 7 に示す．全濃度の比が図中の値になるよう金属イオンを逐次添加した．Ca^{2+}不在下では **2**～**4** のいずれも蛍光強度は非常に弱い．この時の蛍光量子収率は 3×10^{-4}，4.2×10^{-4}，3.3×10^{-4} であった（Table 1）．9-anthracenecarboxylic acid の 0.04[17] に比べ 100 倍程度小さく，TICT による強い蛍光消光が確認された．Ca^{2+}を添加すると蛍光強度は徐々に増加し，Ca^{2+}を過剰量加えたところで一定となった．これは，添加した Ca^{2+}がこれら **2**～**4** と錯体を形成し，化合物中の TICT 機構が抑制されたためと考えられる．**2** 及び **3** においては，蛍光の増大とともに蛍光スペクトルの長波長シフトが観測された．これは，9-AA のシクロヘキサン中における蛍光スペクトルと形状が同一であり，このことから錯体 **2**・Ca^{2+}及び **3**・Ca^{2+}の蛍光は励起状態 II からの発光しているものと考えられる．化合物 **4** の場合，錯体の蛍光スペクトルはグリセリン中の 9-AA で見られた振動構造と同一であり，励起状態 I からの発光と考えられる．また，金属添加前後の蛍光量子収率の変化も 42 倍と最も大きく，効果的に消光を抑制していた．以上の結果は Sr^{2+}，Ba^{2+}存在下においても同様に得られた．しかしながら，Mg^{2+}，Na^{+}，K^{+}については蛍光スペクトルに変化は見られなかった．

Table 1　Complex formation constants (log K) and fluorescence quantum yield of complexes between 2–4 and metal ions in MeCN at 25 ℃

Ligand	Target ions	log K	Φ_f 10^3
2	none	—	0.3
	Ca^{2+}	3.63	3.9
	Sr^{2+}	3.44	2.6
	Ba^{2+}	3.42	1.9
3	none		2.6
	Ca^{2+}	5.67	4.2
	Sr^{2+}	4.35	9.2
	Ba^{2+}	4.53	7.9
4	none		0.33
	Ca^{2+}	6.57	14
	Sr^{2+}	5.71	13
	Ba^{2+}	5.81	12

蛍光と同時に測定した UV-vis スペクトルは，365 nm 付近で **2**～**4** のいずれについても 9-anthracenecarboxylic acid に特徴的な形状を示していた，例として Ca^{2+}不在下及び存在下における **4** の UV-vis スペクトルを Fig. 8 に示す．これは，**2**～**4** のアントラセン環とカルボニル基が立体障害のために，基底状態においては両者の相互作用がない（あるいはほとんどない）事を反映している[16]．さらに，このスペクトルはいずれのアルカリ土類金属イオン存在時においてもほぼ一定であった．この結果は蛍光発光の違いが励起分子の緩和過程の変化による事を示している．また，

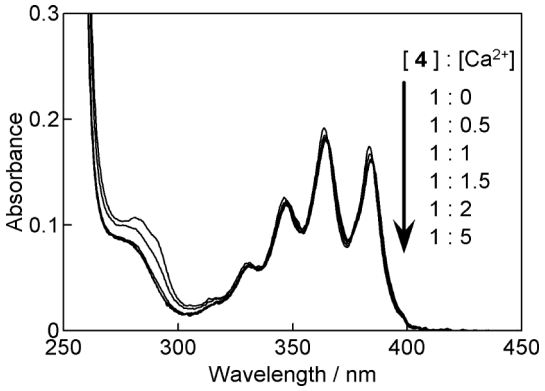


Fig. 8 UV spectra of **4** and its Ca^{2+} complex in MeCN at 25 ℃
[**4**] = 1×10^{-5} M.

275 nm 付近では Ca^{2+} 濃度が増加するにつれ吸光度の低下がみられた．これは金属イオンがベンゼン環近傍に配向し，微視的環境に影響を与えている可能性があるが，蛍光励起波長よりも短波長に位置しているため蛍光発光への直接的な影響は乏しいと考えられる．

続いて錯体形成反応を定量的に検討するために，非線形最小二乗法（Marquardt 法）による錯形成定数（log$K$）の算出を行った[21]．420 nm における蛍光スペクトル強度と [M^{2+}] のプロット上で 1 : 1 錯形成（M + L ⟷ ML）の理論曲線によく一致した．したがって，錯形成が単純な平衡反応によって進行していることが示された．算出した log$K$ 値を Table 1 に示す．**2**～**4** の間で比較すると，**4** は log$K$ 値がいずれの金属イオン（Ca^{2+}，Sr^{2+}，Ba^{2+}）に対しても最も高く，同時に錯体の量子収率も最大であった．したがって，三者の中で **4** は Ca^{2+}，Sr^{2+}，Ba^{2+} を最も高感度で定量的に検出する分析試薬である．

蛍光測定の結果を説明するために，NMR 測定を行った．**2**～**4** を重アセトニトリル溶媒中にそれぞれ溶解し，それぞれ 30 ℃ で測定を行った．その後，金属イオン（Ca^{2+}，Sr^{2+}，Ba^{2+}，Mg^{2+}，Na^{+}）を個別に過剰量添加したのち，同様に測定を行った．スペクトルの各ピークは ^1H-^1H COSY，^1H-^1H NOESY で帰属した．得られた化学シフト値とその変化を Table 2 に示す．**2**～**4** のいずれにも蛍光発光を示した Ca^{2+}，Sr^{2+}，Ba^{2+} に着目すると，金属イオン添加によるアミド基のプロトン（j），ポリオキシエチレン上の酸素に隣接するプロトン（a～h）に低磁場シフトが観測された．これは酸素原子へのカチオンの配位による電子密度の低下によるものであり，金属イオンが配位子とカルボニル基とポリオキシエチレン部位の二か所で配位結合を形成している事を示している．このため，Ca^{2+}，Sr^{2+}，Ba^{2+} の存在下では配位子のカルボニル基の立体構造が固定され，光励起時の TICT が抑制され，蛍光発光に至ったと考えら

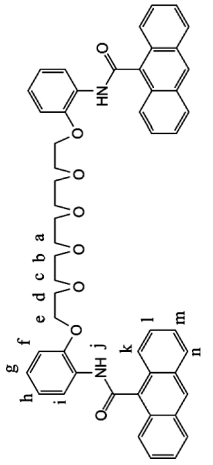


Table 2 Chemcal shifts (δ ppm) of **2**–**4** and their complex with various cations [a)]

ligand	metal ion	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n
2	none			2.41	3.06	3.74	6.94	7.14	7.14	8.46	8.63	8	7.48	8.07	8.53
	Ca^{2+}			0.57	0.29	0.06	−0.15	0.04	−0.1	−0.82	0.54	−0.03	0.02	−0.03	0.07
	Sr^{2+}			0.59	0.3	0.1	−0.15	0.02	−0.11	−0.82	0.41	0	0.01	−0.04	0.06
	Ba^{2+}			0.96	0.5	0.15	−0.25	−0.01	−0.09	−1.11	0.47	0.11	0.1	0.06	0.14
	Na^{+}			0.47	0.14	−0.15	−0.4	−0.05	−0.16	−0.81	0.07	0.02	0.01	−0.03	0.05
3	none		2.42	2.78	3.4	3.97	7.04	7.17	7.17	8.51	8.76	8.06	7.53	8.12	8.58
	Ca^{2+}		0.64	0.5	0.48	0.5	0.07	−0.08	0.22	−1.35	0.83	0.14	0.17	0.08	0.21
	Sr^{2+}		0.5	0.49	0.37	0.32	0.07	0.06	−0.14	−1.19	0.33	−0.07	0.02	0.04	0.16
	Ba^{2+}		0.56	0.53	0.35	0.28	0.11	−0.09	0.11	−1.06	0.21	−0.06	0.03	−0.04	0.06
4	none	2.77	2.69	2.97	3.49	4.02	7.06	7.17	7.15	8.48	8.76	8.06	7.53	8.11	8.59
	Ca^{2+}	−0.06	0.2	0.5	0.13	b)	−0.31	0.05	−0.08	−0.86	0.56	−0.03	−0.01	−0.02	0.08
	Sr^{2+}	0.07	0.3	b)	0.3	0.05	−0.19	0.07	−0.08	−0.87	0.37	0.02	0.01	−0.01	0.07
	Ba^{2+}	−0.15	0.23	0.51	0.41	0.16	−0.24	0.02	−0.08	−1.01	0.29	0.03	0.04	0.01	0.08
	Mg^{2+}	−0.04	0.31	0.37	0.2	0.13	0.06	0.21	−0.03	−0.74	0.7	0.02	0.01	0.01	0.11
	Na^{+}	−0.27	b)	0.14	0.04	−0.06	−0.1	0.08	−0.08	−0.65	−0.04	−0.01	−0.04	−0.02	0

a) Positive values show lower field shifts. The values in "none" indicate the chemical shifts (δ ppm from TMS) of the protons of **2**–**4** in acetonitrile-$d3$ at 30 ℃. b) These values could not be assigned because of overlapping with the water peak.

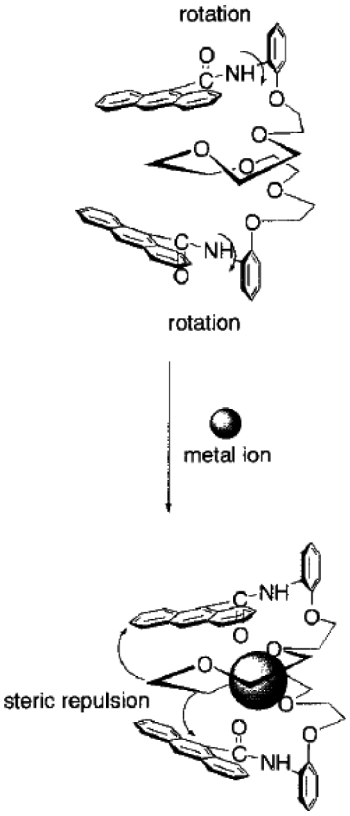


Fig. 9　Schematic representation of before and after complexation between **4** and metal ions in the ground state[10)]

れる．また，アントラセン環については錯形成前後で特徴的なシフトを示すピークは存在せず，錯体形成に関する直接的な関与はみられなかった．蛍光発光に至らなかった Mg^{2+}，Na^{+}については，Mg^{2+}では，アミド基のプロトンjが他のアルカリ土類金属イオンと比べ化学シフト変化値が最も大きく，カルボニル基と強い相互作用を示した．しかしながら，ポリオキシエチレン部位のそれは逆には最小であった．したがって，カルボニル酸素側に偏って配位しており，TICTの発生とともに Mg^{2+}も一緒に移動してしまうものと考えられる．また，Na^{+}についてはポリオキシエチレン部位の化学シフトの変化は大きいもののアミド基の変化は乏しい．したがって，カルボニル基の回転を許容するものと考えられる．以上のことから，Mg^{2+}，Na^{+}は錯形成による分子構造の固定化が十分でないため，TICTの抑制に至らない．

続いて錯形成前後のコンフォメーションの検討を行う．まず，**2**～**4**のいずれのスペクトルにおいてもプロトンa～cが2.4～2.7 ppmの位置で観測された．通常ポリオキシエチレンのピークは3.5 ppm付近であり，大きく高磁場シフトしていた．これは，高磁場シフトであることからアントラセン環の環電流効果によるものと考えられる．そのため，**2**～**4**はらせん状のコンフォメーションを形成している可能性がある．空間充填（CPK）モデルを用いた検討では，らせん構造がアントラセン環による遮蔽効果を受けやすい事を支持していた．金属イオンを添加した際に一部のポリオキシエチレンのプロトンに高磁場シフトが見られたが，これは錯形成時のコンフォメーション変化による環電流効果の増大によるものと考えられる．

次に，**2**～**4**のいずれにおいてもベンゼン環のプロトンiは8.46～8.51 ppmと通常のベンゼン環よりも低磁場でピークが現れた．そして，このプロトンは Ca^{2+}の存在下で大きく高磁場シフトした．同様の結果は他のすべてのイオンの場合についても得られた（0.65～1.01 ppm）．この結果を詳細に検討するために*N*-(2'-methoxyphenyl)-9-antharacenecarboxamide（2'-M-9-AA）と9-AAの ^{1}H NMRスペクトル測定を行った．プロトンiにあたる5'位（2'-M-9-AA）では7.78 ppmであり，2'位（9-AA）では8.49 ppmであった．これらは金属錯体成前後の化学シフトとそれぞれほぼ一致していた．この結果はプロトンiの異常な低磁場シフトがカルボニル基とメトキシ基の立体反発によって引き起こされていることを支持している．つまり，金属イオン不在下で嵩高いメトキシ基とカルボニル基は立体障害によって互いに逆の方向に向いている．しかし，金属イオンが添加されると同一の方向に配向するようになる．NMR測定データを基にして考えられる配位子と金属イオンの錯形成挙動をFig. 9に示す．

後続の研究において，TICT部位のアントラセン置換基位置のみを9位から1位または2位に変えた*N*,*N*'-[Ethylenedioxybis(3-oxapentamethyleneoxy)-2-phenyl]-bis(1-anthracenecarboxamide)を合成した．これは**4**と同様の ^{1}H NMRスペクトル挙動を示した[22)]．すなわち，環電流効果によるポリオキシエチレン部位の高磁場シフト（δ = 2.86～3.16 ppm），アミドに隣接するベンゼン環のプロトンの低磁場シフト（δ = 8.45 ppm）と錯形成によるシフトの解消（$\Delta\delta$ = 0.79～0.94 ppm）である．また，錯体形成前後で蛍光スペクトル強度が大きく変化することは定量分析や肉眼での識別に有用である．同一波長における，金属イオン不在下での蛍光強度（I_0）と金属存在下の最大蛍光強度（I_{max}）の比 I_{max}/I_0 は，**4**の場合に比べて Ca^{2+}で2倍，Sr^{2+}で1.5倍，Ba^{2+}で1.4倍向上した．

3･2･2　非対称型ポリオキシエチレンTICTセンサー

Mg^{2+}及び Ca^{2+}は生体機能に関して重要な役割を果たすため，これらの識別は重要なテーマである．ポリオキシエチレンの両末端に蛍光部位を対称的に導入した**2**～**4**は，Ca^{2+}の存在下では蛍光が増大し，Mg^{2+}については非応答的であった．これに対し，蛍光部位を非対称に導入した**5**（Fig. 10）では Mg^{2+}とアルカリ土類金属間で発光の違いが現れた[23)]．

アセトニトリル中における化合物**5**の蛍光スペクトルを

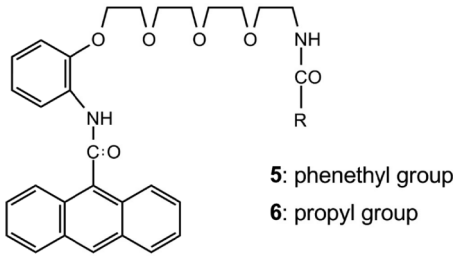


Fig. 10 Chemical structures of **5** and **6**

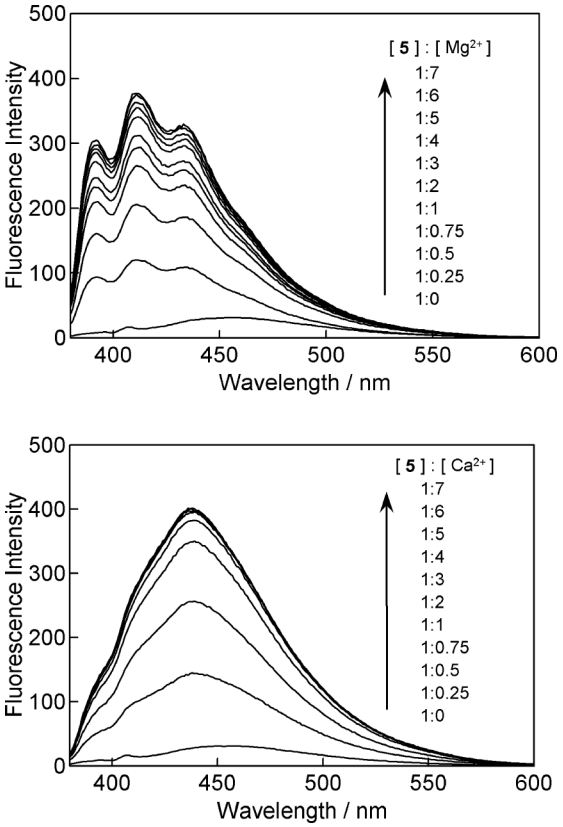


Fig. 11 Fluorescence spectra of **5** and its Mg^{2+} complex and **5** and its Ca^{2+} complex in MeCN at 25 ℃

Excitation wavelength 363 nm ; [**5**] = 1×10^{-5} M.

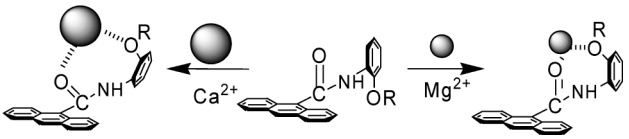


Fig. 12 Schematic representation of the molecular configuration of Mg^{2+} and Ca^{2+} [19]

R : Oxyethylene and terminal benzene moiety were omitted for clarity.

Table 3 Fluorescence spectral data for **5** and **6**: Wavelength of fluorescence maxima (λ_{max}), fluorescence intensity ratios (I_{max}/I_0) at λ_{max} and complex formation constants (log K)

		Mg^{2+}	Ca^{2+}	Sr^{2+}	Ba^{2+}
1	λ_{max}	411 nm	438 nm	438 nm	438 nm
	I_{max}/I_0	16.4	15.1	12.1	5.8
	log K	5.49	6.26	5.55	5.43
2	λ_{max}	411 nm	438 nm	439 nm	440 nm
	I_{max}/I_0	28.8	14.9	10.2	5.9
	log K	5.72	6.88	5.92	5.20

示す（Fig. 11）．金属イオン不在下では，蛍光発光は **2**～**4** と同様に非常に弱く，蛍光発光のピークは 9-アントラセンのそれよりも長波長シフトした 460 nm であった．これはアントラセン環とベンゼン環との間で生じたエキシプレックスと考えられる．芳香環をもたない **6** の蛍光スペクトルではそのような長波長シフトは観測されなかった．**5** に Mg^{2+} を添加すると，その蛍光スペクトルは蛍光強度が増大し，また形状は 9-anthacenecarboxylic acid に特徴的な 410 nm に最大ピークを持つ振動型構造が現れた．これは，Mg^{2+} 添加によりエキシプレックスが解消され TICT による消光過程が抑制されたことを示している．他方，Ca^{2+} を添加した場合では同様に蛍光が増大するものの，π 共役が存在するような 440 nm にピークをもつブロードなピークが観測された．Sr^{2+}，Ba^{2+} についても同様の結果が得られた．これらの違いは，Mg^{2+} とそれ以外のアルカリ土類金属イオンがスペクトルの形状により識別可能であることを示している．

スペクトル形状の違いは次のように考えられる．Mg^{2+} はカルボニル部位とポリエーテルの TICT 末端側に配位し効果的に励起状態の π 共役を切断するのにちょうどよいイオン半径をもつ（Fig. 12）．しかしながら，Mg^{2+} と比べ大きなイオン半径を持つ Ca^{2+}，Sr^{2+}，Ba^{2+} では，カチオンが TICT 部位との立体反発を避けポリエーテルよりに配位する．そのために，効果的に TICT を抑制する 90° ねじれたコンフォメーションから逸脱し部分的な π 共役を可能にしていると考えられる．

Marquardt 法を用いて錯形成定数（log$K$）を算出すると，1 : 1 錯体の理論曲線に一致し，単一の平衡による錯体形成反応が示された．結果は Table 3 に示す．log$K$ 値を比較すると，**5** が **6** に比べ全体的に大きな値をとる傾向にあった．そのため **5** のフェニルエチル部位は錯形成能力の向上に寄与している可能性がある．I_{max}/I_0 の比較では **6**・Mg^{2+} が最大となった．これは，錯体形成の際にスペクトルが大きくブルーシフトしたために，free の発光強度が低い波長で I_{max}/I_0 値を算出することができたためである．このような I_{max}/I_0 値の向上はイオンの識別性能を高めると考えられる．また，イオン半径の増大に伴い I_{max}/I_0 が低下する傾向にある．これは，イオンの増大が TICT 抑制の程度に影響

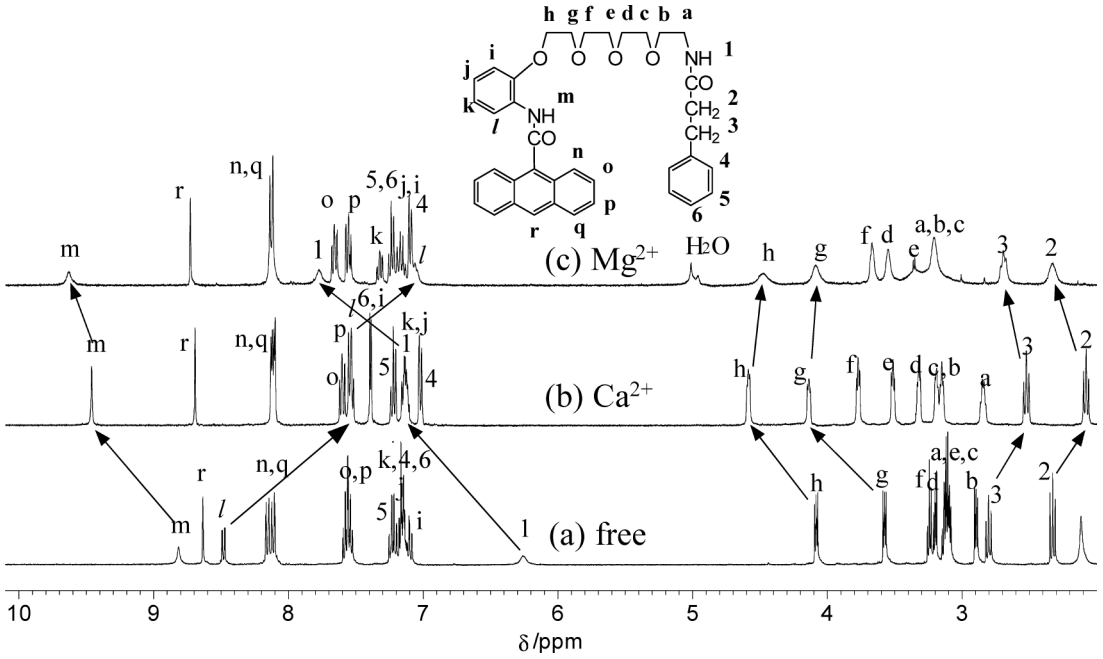


Fig. 13　^{1}H NMR spectra of **5** and its complex with Ca^{2+} (b) or Mg^{2+} (c) [19]

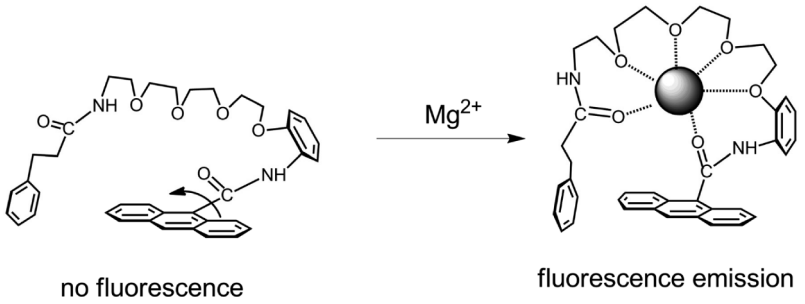


Fig. 14　Schematic representation of free **5** and its complex with Mg^{2+} in the ground state

するという上述の見解を支持している．

蛍光測定で得られた知見を明確にするために，NMR スペクトルを測定した．重アセトニトリルにおける **5** と Mg^{2+} 及び Ca^{2+} の錯体の ^{1}H NMR スペクトルを Fig. 13 に示す．金属イオンは **5** に対し十分過剰に添加し，各ピークは ^{1}H-^{1}H COSY，^{1}H-^{1}H NOESY で帰属した．金属不在化（a）と添加（b），（c）時で比較すると，TICT 部位に近いオキシエチレン部位（f～h）において $\Delta\delta = 0.39 \sim 0.56$ ppm の低磁場シフトが観測された．対照的に，離れた位置にある部位（a～c）では $\Delta\delta = -0.27 \sim 0.27$ ppm の高磁場シフトであり，配位による相互作用の程度はプロトン f～h に比べ小さいと考えられる．アミド部位 m に着目すると，$\Delta\delta = 0.66$（Ca^{2+}），$\Delta\delta = 0.83$（Mg^{2+}）であり，化学シフト変化に 0.17 ppm の差が生じていた．もう一方のアミド部位 1 では，$\Delta\delta = 0.89$（Ca^{2+}），$\Delta\delta = 1.52$（Mg^{2+}）であった．プロトン m 及び 1 とは対照的に，プロトン 1 では $\Delta\delta = -0.93$（Ca^{2+}），$\Delta\delta = -1.41$（Mg^{2+}）の大きな高磁場シフトが観測された．これらの結果は，アミド部位のカルボニル酸素が Ca^{2+} に比べ Mg^{2+} と強く配位していることを示しており，イオン半径の違いによって錯体の構造が異なるという蛍光測定での見解を支持している．以上の検討をもとに **5** と Mg^{2+} の錯体構造を Fig. 14 に示す．

5 ではターゲット種により蛍光スペクトル形状に差が現れた．これはスペクトルの波長方向による識別に可能性を与える．ターゲット種を識別するもうひとつの方法は，スペクトルの強度を用いるものである．次に，Mg^{2+} のみに対して強く蛍光発光する **7** を報告する[24]．

アセトニトリル中における化合物 **7** の蛍光スペクトルでは，金属イオン不在下では，蛍光発光は強度が低く，長波長側にシフトしたスペクトルが観測された（Fig. 15）．Mg^{2+} 存在下では，蛍光の増大し振動構造のスペクトルが観測された．他方，Ca^{2+} 存在下では Sr^{2+}，Ba^{2+} についても同様に観測された．これらのスペクトル挙動は蛍光発光部位が類似している **5** と一致した．しかしながら，Mg^{2+} を除く

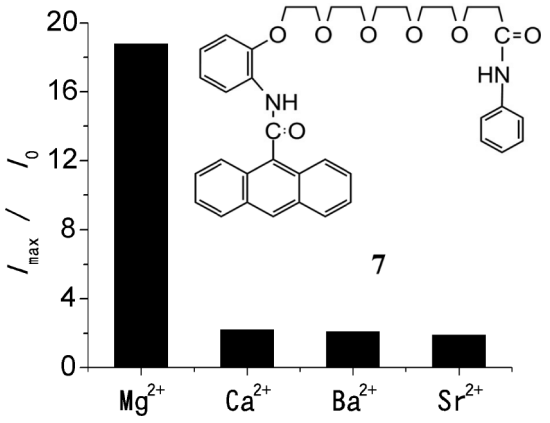


Fig. 15 Fluorescence intensity ratios (I_{max}/I_0) between presence and absence of alkaline earth metal ions at 413 nm (Mg^{2+}) or 440 nm (other cations) where fluorescence maximum peaks were observed
[**7**] = 1×10^{-5} M

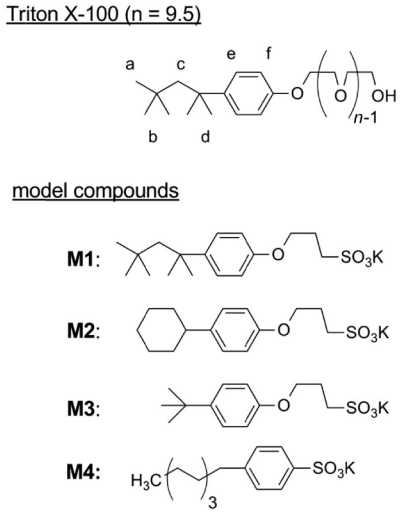


Fig. 17 Structures of Triton X-100and its model compounds (**M1**–**M4**)

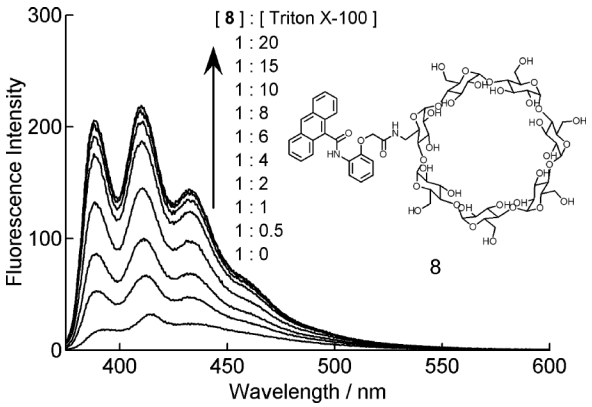


Fig. 16 Fluorescence spectra of **8** and its complex with Triton X-100 in water at 25 ℃
Excitation wavelength 365 nm ; [**8**] = 5.0×10^{-6} M.

金属イオンは蛍光強度の大きな増大は観測されなかった．これは，**7** と **5** の分子構造の違いが錯形成挙動に影響を与えたものと考えられる．**5** ではイオン半径の増大に伴い I_{max}/I_0 値は低下していたが，**7** の場合では Ca^{2+}，Sr^{2+}，Ba^{2+} 間でほぼ同一であった．これらのイオンは **5** と比べて配位酸素数が多いポリオキシエチレン部位で錯体を形成し，TICT 部位との相互作用が低下しているものと思われる．

金属イオン種に対する蛍光“Off-On”挙動の差を評価するために I_{max}/I_0 を算出した（Fig. 16）．発光強度の差は Mg^{2+} とそれ以外で約 9～10 倍となった．この結果は **7** が Mg^{2+} に対し特異的に発光する事を示している．また，ポリオキシエチレンのユニット数が増大しているため Na^+，K^+ に対する蛍光応答性の影響を検討したが，蛍光スペクトルの変化は（$I_{max}/I_0 = 1$）現れなかった．Marquardt 法を用いて錯形成定数（log$K$）を算出すると，Mg^{2+} においては 1 : 1 錯体の理論曲線に一致し単一の平衡による錯体形成反応が示された（log$K$ = 4.79）．しかし，それ以外の金属イオンについては算出することが出来なかった．

3･3 シクロデキストリン修飾型 TICT センサー

TICT は立体障害を利用した蛍光の“Off-On”制御を行っている．そのため，電荷を持たない中性の有機化合物の検出に対して応用可能である．ここでは，非イオン性界面活性剤 Triton X-100 の検出試薬について報告する[25]．

TICT 部位にアントラセンアミド，認識部位にシクロデキストリン（CD）を用いた **8** を合成した．Fig. 16 に Triton X-100 不在下及び存在下における **8** の蛍光スペクトルを示す．ミセル化の影響を除くために Triton X-100 は臨界ミセル濃度（0.2 mM）以下になるよう測定を行った．**8** の蛍光強度は Triton X-100 の添加に伴い増大し，I_{max}/I_0 = 9.8 であった．これに対し，CD と錯体を作ることでよく知られているアダマンタンカルボン酸では I_{max}/I_0 = 2 であり，蛍光強度比に 5 倍近くの差が現れた．この蛍光発光の選択性の詳細を検討するために，Triton X-100 に類似した Triton X-405 及びモデル化合物 **M1**～**M4**（Fig. 17）を用意し同様に測定を行った（Table 4）．親水基部位のみが異なる Triton X-405 及び M1 では I_{max}/I_0 値の差は小さい．また，ポリエチレングリコールでは I_{max}/I_0 = 1.1 であり，水酸基成分が蛍光応答性に与える影響はわずかであると考えられる．一方，疎水性部位の立体構造が異なる **M2**～**M4** についてはいずれも I_{max}/I_0 が大きく低下した．以上の事から，**8** の Triton X-100 に対する選択性は，ターゲット分子の立体障害の差に基づくと考えられる．つまり，立体障害の大きな疎水基が錯体形成によって **8** の TICT を効果的に抑制していると考えられる．

Table 4　Fluorescence intensity ratio (I_{max}/I_0) and complex formation constants ($\log K$) of Ant-CD for various guest materials in water at 25 ℃

	TX-100	TX-405	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**
I_{max}/I_0	9.8	9.5	9.2	2.7	2.0	2.3
$\log K$	5.20	5.02	5.24	4.46	3.98	3.84

Table 5　^{1}H-NMR chemical shifts (δ ppm) for 1×10^{-3} M of Triton X-100 before and after complexation consisting of **8** and 0.5×10^{-3} M of Triton X-100 with 1 mM of native β-CD. Alphabets on respective peaks correspond to hydrogens in Fig. 17

	a	b	c	d	e
TX-100	0.67	1.64	1.26	7.22	6.82
Ant-CD with TX-100	0.17	1.42	1.27	7.17	6.88
native β-CD with TX-100	0.80	1.75	1.48	7.37	6.99

蛍光スペクトルの強度より非線形最小2乗法（Marquardt法）を用いて錯形成定数を算出した．いずれのターゲット分子についても1：1錯体形成の理論曲線によく一致した．このことから，錯体形成が単一の平衡反応のみで進行している事が示された．

蛍光スペクトル測定で得られた見解を検証するために，^{1}H NMR測定を行った．Triton X-100重水溶液にAnt-CDを少量ずつ添加したときの^{1}H NMRスペクトルの化学シフトをTable 5に示す．各ピークは^{1}H−^{1}H COSY及び^{1}H−^{1}H NOESY測定より帰属した．**8**の増大に伴いTriton X-100の先端，*tert*-ブチル部位（a）のピークが大きくシフトし，隣接する（b），（c）のアルキル部位にもシフトが観測された．TICT部位を付加していない未修飾CDを用いて同様に測定すると，スペクトルの化学シフト変化は，その大きさ・方向に異なりを示した．したがって，Ant-CD添加における化学シフト変化は，CDの修飾部位すなわちTICT部位との相互作用を示し，同時にTriton X-100の疎水部位とTICT部位が近接している事を示している．特にTriton X-100のプロトン（a）が大きくシフトしており，環電流効果を受けていると考えられる．したがって，**8**はTriton X-100とプロトン（a）がTICT部位に組み込まれた錯体を形成していると考えられる（Fig. 18）．以上の事は，立体障害の大きなTriton X-100が効果的にTICTを抑制している，という蛍光測定からのを支持している．

Ant-CD系においてもTICT性を示すかどうかを確認するために，水−グリセリン混合溶媒中における蛍光スペクトルを測定した．グリセリンの比率が増大するにつれて蛍光強度の増大（40倍）が観測された．また極性の影響を考慮するために水−ジオキサン混合溶媒を用いて同様に測定した．極性の低下に伴う蛍光強度の増大は2倍と低く，蛍光発光の増大は粘性の増大が主要因であることが確認された．

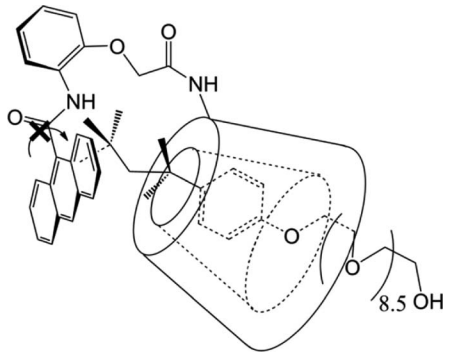


Fig. 18　Schematic representation of TICT preventing a motion of 9-AA moiety based on the complexation between Ant-CD with TX-100 [20]

4　結　　言

これまでに，PET，TICTを用いた蛍光“Off-On”型化学センサーを新規合成し，その蛍光発光性と錯体形成挙動を検討してきた．分析試薬の蛍光発光性，感度などの性能はその試薬とターゲット分子の立体構造に敏感であった．したがって，高感度，高選択性の定量分析試薬を設計するためには，分析試薬とターゲット分子の相互作用の因果関係を明確にすることが重要であると考えられる．本研究ではモデル化合物とNMRを使用し蛍光応答性の違いを錯形成構造から明らかにした．そして，イオン半径に着目し分析試薬との立体効果を利用することで金属イオンを識別可能であることを示した．また，電荷をもたない中性有機分子の識別も可能であることを示した．これらの結果はTICTを用いた分析試薬の可能性を広げるものであり，新規分析試薬を用いた簡便かつ迅速な分析法の開発に有用である．

文　　献

1) A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice：*Chem. Rev.*, **97**, 1515 (1997).
2) B. Valeur：“*Molecular fluorescence, principles and applications*”, p. 274 (2006), (Wiley-VCH).
3) M. Takagi, H. Nakamura, K. Ueno：*Anal. Lett.*, **10**, 1115 (1977).
4) M. Takagi, H. Nakamura：*J. Coord. Chem.*, **15**, 53 (1986).
5) J. F. Callan, A. P. de Silvaa, D. C. Magria：*Tetrahedron*, **61**, 8551 (2005).
6) H. Hama, T. Morozumi, H. Nakamura：*Anal. Sci.*, **23**, 1257 (2007).
7) Y. Oka, H. Hama, T. Morozumi, H. Nakamura：

Anal. Sci., **25**, 617 (2009).
8) K. Rotkiewicz, K. H. Grellmann, Z. R. Grabowski : *Chem. Phys. Lett.*, **19**, 315 (1973).
9) Z. Grabowski, J. Dobkowski : *Pure. Appl. Chem.*, **1983**, 245.
10) T. Hayashi, N. Mataga, T. Umemoto, Y. Sakata, S. Misumi : *J. Phys. Chem.*, **81**, 228 (1977).
11) K. A. Norton, J. K. Hurst : *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5960 (1982).
12) S. K. Sahaa, P. Purkayasthaa, A. B. Dasb, S. Dharac : *J. Photoch. Photobio. A*, **199**, 179 (2008).
13) T. Morozumi, T. Anada, H. Nakamura : *J. Phys. Chem. B*, **105**, 2923 (2001).
14) N. S. Bezilevskaya, A. S. Cherkasov : *Opt. Spectrosc.*, **18**, 30 (1965).
15) N. S. Bezilevskaya, A. S. Cherkasov, A. S. Zh : *Zh. Prikl. Spectrosk. Akad. Nauk. Beloruss., SSR*, **3**, 548 (1965).
16) T. C. Werner, D. M. Hercules : *J. Phys. Chem.*, **73**, 2005 (1969).
17) S. Suzuki, T. Fuji, N. Yoshiike, S. Komatsu, T. Iida : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51**, 2460 (1978).
18) R. A. Agbaria, M. T. Butterfield, I. M. Warnar : *J. Phys. Chem.*, **100**, 17133 (1996).
19) I. Azumaya, H. Kagechika, Y. Fujiwara, M. Itoh, K. Yamaguchi, K. Shudo : *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2833 (1991).
20) A. S. Cherkasov, V. A. Molchanov, T. M. Vember, K. G. Voldaikina : *Sot. Phys. Dokl.*, **1**, 427 (1956).
21) D. M. Marquardt : *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, **11**, 431 (1963).
22) J. Kim, T. Morozumi, H. Hiraga, H. Nakamura : *Anal. Sci.*, **25**, 1319, (2009).
23) J. Kim, T. Morozumi, H. Nakamura : *Org. Lett.*, **9**, 4419 (2007).
24) J. Kim, T. Morozumi, H. Nakamura : *Chem. Lett.*, **38**, 994 (2009).
25) Y. Oka, S. Nakamura, T. Morozumi, H. Nakamura : *Talanta*, **82**, 1622 (2010).

Progress of the Fluorescent Chemosensor Based on the Control of Twisted Intramolecular Charge Transfer

Yoshikazu OKA[1], Tatsuya MOROZUMI[2] and Hiroshi NAKAMURA®[2]

® E-mail : nakamura@ees.hokudai.ac.jp

[1] Division of Environmental Materials Science, Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University, Kita10-Nishi5, Sapporo-shi, Hokkaido 060-0810
[2] Section of Materials Science, Faculty of Environmental Science, Hokkaido University, Kita10-Nishi5, Sapporo-shi, Hokkaido 060-0810

(Received October 14, 2011 ; Accepted January 17, 2012)

Analytical reagents have a function to recognize the state of an experimental system such as a species and its concentration by visualization. The sensitivity and selectivity are strongly requested in the development of a novel indicator. To fulfill these purposes, twisted intramolecular charge transfer (TICT) mechanisms have been employed for the development of novel fluorescent chemosensors in our study. In this paper, we report on the TICT mechanism of *N*-phenyl-9-anthacenecarboxamide (9-AA) as a fundamental structure and 9-AA derivatives to detect alkaline earth metal ions and a surfactant.

Keywords **:** twisted intramolecular charge transfer ; photoinduced electron transfer ; chemosensor ; polyoxyethylene ; cyclodextrin.