

# 論文内容の要旨

## 論文題目

高感度発蛍光試薬の開発を指向した蛍光量子収率( $\Phi_f$ )予測法

氏 名

内山 聖一

### 【目的】

蛍光誘導体化試薬を用いた HPLC-蛍光検出法は、感度・選択性に優れ、微量物質の定量法として繁用されている。現在までに、多くの蛍光誘導体化試薬が開発されているが、中でも試薬自身が無蛍光性である発蛍光試薬は、過剰量の試薬に由来する妨害がないことから微量分析に適している。当研究室では、蛍光団として分子サイズが小さく、長波長の励起・蛍光波長を有するベンゾフラザン骨格(Fig.1)を選択し、アミン用の発蛍光試薬 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole(NBD-F: 4 位置換基  $R_4$ /7 位置換基  $R_7=F/NO_2$ )、チオール用の ammonium 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate ( $R_4/R_7=SO_3^-NH_4^+/F$ )などを開発してきた。しかし、さらなる発蛍光試薬の設計・開発のためには、従来その確立が困難であるとされてきた蛍光強度の予測法が必要不可欠と考えられた。以上の背景から、修士課程において 4,7 位置換ベンゾフラザン化合物における構造と蛍光強度の関係解明を試みた結果、これら化合物の蛍光強度は置換基の電子的効果によって決定されていることが明らかになり、置換基の Hammett 定数( $\sigma_p$ )と蛍光特性を関係付けることに成功した。また、分子軌道法により算出した蛍光団の電子密度、双極子モーメントと蛍光特性の間にも同様の関係が得られ、初めて一つの骨格に対して分子構造から蛍光性の有無を予測可能とした。さらに、得られた関係に基づき従来報告のなかったアルコール用発蛍光試薬 7-phenylsulfonyl-4-(2,1,3-benzoxadiazolyl) isocyanate ( $R_4/R_7=NCO/SO_2Ph$ )の開発にも成功した。

博士課程ではこれらの結果を踏まえ、より正確な蛍光

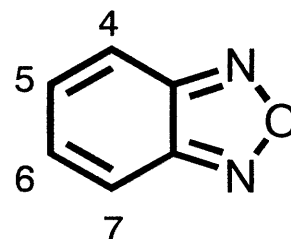


Fig.1 ベンゾフラザン骨格

強度予測法の確立を目的とした。もし、構造から蛍光量子収率( $\Phi_f$ )の大きさを予測することができれば、試薬の設計の際に、誘導体の $\Phi_f$ 値についての情報を得ることが可能となり、発蛍光試薬を用いた HPLC-蛍光検出法のさらなる高感度化に寄与できると考えた。さらに、得られた予測法に基づいて高感度発蛍光試薬の開発を試みた。

### 【置換基内に芳香環を有するベンゾフラザン化合物の $\Phi_f$ 値予測法】

上記関係を検討中、いくつかのベンゾフラザン化合物については、その蛍光性が予測困難であることがわかった。例えば、NBD-F のグリシン誘導体である NBD-Gly とトリプトファン誘導体である NBD-Trp は、7 位に  $\text{NO}_2$  基、4 位に  $\text{NHCH}(\text{COOH})$ -基と類似の構造を持つ。そのため、ベンゾフラザン骨格の電子状態は両者でほとんど変わらないが、NBD-Gly が強い蛍光性を有するのに対し、NBD-Trp は無蛍光性であった。この知見から、ベンゾフラザン化合物には蛍光団の電子状態以外に蛍光性を決定する要因が存在すると考えられた。NBD-Trp に対し、4 位置換基に含まれるインドール環を開環させると蛍光性の化合物となることから、NBD-Trp を無蛍光性にする機構はベンゾフラザン骨格とインドール環の光誘起電子移動 (Photoinduced Electron Transfer: PET) に基づいていると考えた。

そこで、まずどのような芳香環が蛍光団の $\Phi_f$ 値に影響を与えるかを調べるため、蛍光性化合物 NBD-NHMe ( $R_4/R_7=\text{NHMe}/\text{NO}_2$ ) の溶液に対して芳香族化合物を添加し、吸収・蛍光スペクトルを測定した。その結果、最大吸収波長、モル吸光係数および最大蛍光波長は変化しなかったものの、添加する芳香族化合物によっては NBD-NHMe の消光現象が確認された。Stern-Volmer 式により各芳香族化合物の消光能を表す  $K$  値を算出し、芳香環の電子密度を表す HOMO, LUMO エネルギーと比較したところ、HOMO エネルギーの大きい化合物もしくは LUMO エネルギーの小さい芳香族化合物ほど  $K$  値が大きくなり (Table 1)、この消光が添加した芳香族化合物と励起状態にある NBD-NHMe の分子間電子移動に由来することが確認された。次に、NBD-NHMe の 4 位置換基末端に芳香環を有する誘導体 ( $R_4/R_7=\text{NHCH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-R}/\text{NO}_2$ ) を合成し、その吸収・蛍光スペクトルを測定したところ、最大吸収波長、モル吸光係数および最大蛍光波長は NBD-NHMe とほとんど変わらなかった。一方、添加実験において、 $K$  値の大きい芳香族化合物に対応する芳香環を置換基内に有する化合物ほど $\Phi_f$ 値が低下していた (Table 1)。以上より、置換基内に芳香環を有するベンゾフラザン化合物の $\Phi_f$ 値においては PET による影響があることが明らかとなり、 $\Phi_f$ 値の大

**Table 1** ベンゾフラザン環と他の芳香環による分子間消光と分子内消光

NBD-NHMeに対する芳香族化合物の添加実験				誘導体 ( $\text{-NHCH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-R}/\text{-NO}_2$ ) の蛍光特性				
添加した芳香族化合物	$K / \text{L mol}^{-1}$	HOMO / eV	LUMO / eV	R	$\lambda_{\text{ab}} / \text{nm}$	$\epsilon / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	$\Phi_f$
Aniline	119.4	-9.015	0.080	$\text{NH}_2$	464	2.11	522	< 0.001
Acetanilide	2.3	-9.232	-0.164	NHAc	461	2.11	523	0.14
Anisole	0.2	-9.471	0.040	OMe	459	2.32	524	0.15
Chlorobenzene	— <sup>a</sup>	-9.652	-0.139	Cl	455	2.34	521	0.29
Toluene	— <sup>a</sup>	-9.715	0.080	Me	458	2.36	522	0.27
Benzene	— <sup>a</sup>	-10.018	0.125	H	457	2.16	524	0.37
Nitrobenzene	2.5	-10.270	-1.058	$\text{NO}_2$	452	1.99	520	0.31
<sup>a</sup> 消光は観測されなかった				c.f. NBD-NHMe	458	2.30	524	0.38

小は、添加実験による  $K$  値の算出や、分子軌道計算による HOMO, LUMO エネルギーの算出によって予測可能となった。

### 【種々の置換基を有するベンゾフラザン化合物の $\Phi_f$ 値予測法】

$\sigma_p$  値と蛍光性の関係から、ベンゾフラザン化合物の  $\Phi_f$  値は蛍光団の電子状態によって決定づけられていると考えられるため、まず、4 位置換化合物における  $\Phi_f$  値と分子軌道法によって得られる蛍光団のエネルギー準位の関係についてその解明を試みた。11 種化合物 ( $R_4=H, NMe_2, NH_2, SMe, SPh, NHAc, OMe, SO_2Me, F, SO_2Ph, NO_2$ ) を合成し、その吸収・蛍光スペクトルをシクロヘキサン (CH) 中にて測定した。また、最適なエネルギー準位の計算法は CH 中における  $S_0-S_1$  遷移エネルギーと分子軌道法により得られた  $S_0-S_1$  遷移エネルギーを比較することにより選択した。その結果、構造最適化およびエネルギー準位計算に、半経験的分子軌道法 PM3 法および PM3-CAS-CI (CI=5) 法を用いると、実測と計算の  $S_0-S_1$  遷移エネルギーの間に良好な比例関係が得られた (相関係数  $r = 0.949$ )。そこで、この計算法によって得られたエネルギー準位と CH 中の  $\Phi_f$  値を比較したところ、 $T_2$  状態と  $S_1$  状態のエネルギー差  $\Delta E(T_2-S_1)$  と  $\Phi_f$  値の間に良好な関係が得られ (Fig.2)、大きい  $\Delta E(T_2-S_1)$  値を与える化合物ほど  $\Phi_f$  値が大きくなることが判明した。一方、5 位置換化合物については光分解実験、熱レンズ測定、過渡吸収スペクトル測定から、 $S_2$  状態と  $S_1$  状態が離れている化合物ほど励起状態からの光分解が起こりにくくなることが判明し、 $\Delta E(S_2-S_1)$  値と  $\Phi_f$  値の間に良好な関係が得られた (Fig.3)。同様に、4,7 位置換化合物に対しても  $\Delta E(T_2-S_1)$  および  $\Delta E(S_2-S_1)$  値が大きいほど、 $\Phi_f$  値が大きくなるという関係が得られ、ベンゾフラザン化合物の  $\Phi_f$  値の大小は、半経験的分子軌道法により、予測可能であることが明らかとなった。

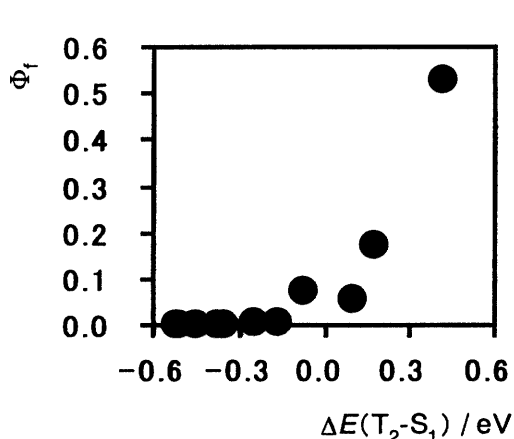


Fig.2 4位置換化合物における  $\Delta E(T_2-S_1)$  と  $\Phi_f$  の関係

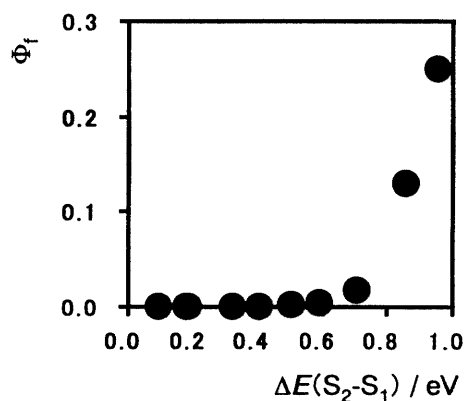


Fig.3 5位置換化合物における  $\Delta E(S_2-S_1)$  と  $\Phi_f$  の関係: 構造最適化には AM1 (EXCITED) 法, エネルギー準位計算には AM1-CAS-CI (CI=6) 法を使用

### 【高感度カルボン酸用発蛍光誘導体化試薬の開発】

$\Delta E(T_2-S_1)$  および  $\Delta E(S_2-S_1)$  値が大きい化合物ほど  $\Phi_f$  値が大きいという関係を利用して、既存の試薬に対して高感度化が可能であるカルボン酸用発蛍光試薬の開発を行った。まず、

カルボン酸との反応部位として4位置換基にSH基を選択した。次に、 $\sigma_p$ 値と蛍光性の関係を用いることにより、 $\sigma_p$ 値が $-0.27 \sim 0.03$ である置換基、すなわちOMe( $\sigma_p = -0.27$ )、Me( $-0.17$ )、SMe(0.00)、NHAc(0.00)基などを7位として選択した際に、発蛍光試薬となることがわかった。そこで、これら4種の酢酸誘導体について分子軌道計算を行ったところ、 $\Delta E(T_2-S_1)$ 値は、7位置換基によってSMe(0.989 eV) > NHAc(0.557) > OMe(0.399) > Me(0.106)、 $\Delta E(S_2-S_1)$ 値はSMe(0.990 eV) > OMe(0.952) > NHAc(0.911) > Me(0.743)となり、7位にSMe基を有する誘導体の $\Phi_f$ 値が最も大きいと予測された。以上より4-mercapto-7-methylthio-2,1,3-benz-oxadiazole(MTBD-SH:  $R_4/R_7 = \text{SH/SMe}$ )を最も高感度な発蛍光試薬として設計した。MTBD-SHは2,6-difluoroanilineより5工程で合成し、さらに酢酸との誘導体としてMTBD-SAc( $R_4/R_7 = \text{SAc/SMe}$ )を得た。MTBD-SH、MTBD-SAcの吸収、蛍光スペクトルを測定したところ、予測通りMTBD-SHは無蛍光性であり、MTBD-SAcは強い蛍光性であった(Table 2)。また、MTBD-SAcの $\Phi_f$ 値は比較のために合成した化合物AABD-SAc( $R_4/R_7 = \text{SAc/NHAc}$ )の $\Phi_f$ 値の2~5倍であり $\Delta E(T_2-S_1)$ 、 $\Delta E(S_2-S_1)$ 値による予測法の正確性が立証された。MTBD-SHとカルボン酸の誘導体化反応は、縮合剤の存在下、室温1分以内に完結した。実際に、5種類の脂肪酸をMTBD-SHによって誘導体化し、逆相HPLCによって分離分析を行った結果、各誘導体のみが良好に検出され(Fig.4)、それらの検出限界は2.4~5.0 fmol(S/N=3)であった。以上より、MTBD-SHが高感度かつ高反応性のカルボン酸用発蛍光試薬であることが確認された。

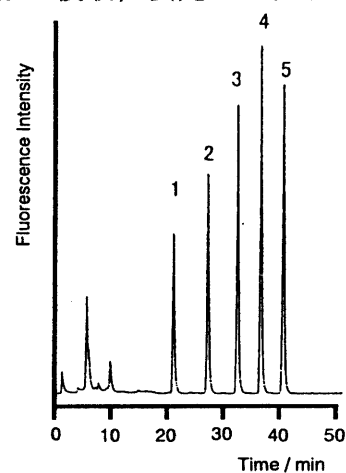


Fig.4 5種カルボン酸誘導体の分離検出  
(1) *n*-caprylic, (2) *n*-capric, (3) lauric,  
(4) myristic, (5) palmitic acids 各10 pmol  
ex.391, em.519 nm

Table 2 MTBD-SHおよびMTBD-SAcの吸収・蛍光特性

溶媒	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>			MeCN			MeOH		
	$\lambda_{ab}$ / nm	$\lambda_{em}$ / nm	$\Phi_f$	$\lambda_{ab}$ / nm	$\lambda_{em}$ / nm	$\Phi_f$	$\lambda_{ab}$ / nm	$\lambda_{em}$ / nm	$\Phi_f$
MTBD-SH (試薬)	410	528	0.0018	411	526	0.00050	409	515	0.00026
MTBD-SAc (誘導体)	389	510	0.52	391	519	0.27	387	529	0.095
c.f. AABD-SAc	369	507	0.20	370	515	0.12	367	522	0.020

## 【まとめ】

本研究では、ベンゾフラザン化合物の $\Phi_f$ 値に影響を与える要因、すなわち置換基に含まれる芳香環と蛍光団の間で起こるPET、およびベンゾフラザン骨格に直接結合する置換基により決定する蛍光団のエネルギー準位について検討を行い、ベンゾフラザン化合物の $\Phi_f$ 値に対する予測法を得ることに成功した。本研究の結果は、簡潔で一般性がある上に、分子レベルで起きている現象に基づいているため、物理化学的見地から大変意義深いといえる。また開発した試薬MTBD-SHは、従来の試行錯誤による方法では設計することが難しいと考えられ、構造と $\Phi_f$ 値の関係が、新しい蛍光試薬の開発に大きく役立つことを示した。 $\Phi_f$ 値の予測法は、他の蛍光団に対しても同様の手法で導くことが可能であると考えられ、本研究の結果が、実用性の高い発蛍光試薬の開発分野における指針となることを期待している。