

## 審査の結果の要旨

氏名 内山 聖一

試薬自身が無蛍光性である発蛍光試薬は、過剰量の試薬由来の妨害がないことから、HPLC-蛍光検出法のみならず広く自然科学分野で用いられている。この中で、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は前任者により選択され、アミン用の発蛍光試薬 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F), チオール用の ammonium 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate (SBD-F) などが開発されている。しかし、これらは試行錯誤的に開発されてきたものである。そこで筆者は、さらなる発蛍光試薬の設計・開発のためには、蛍光量子収率 ( $\Phi_f$ ) の予測法が必要不可欠と考えた。ベンゾフラザン化合物の構造と蛍光特性の関係を、置換基の Hammett 定数 ( $\sigma_p$ ) を用いた経験的方法および分子軌道計算による理論的方法により解析し、化合物の構造から蛍光量子収率を予測する方法を開発した。また、このようにして得た予測法に基づいて高感度発蛍光試薬を開発した。

### 1. 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

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、前者が強い蛍光性を有するのに対し、後者は無蛍光性であった。両者は 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。従って、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、蛍光性ベンゾフラザン化合物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が、添加する芳香族化合物によっては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、この消光が添加した芳香族化合物と励起状態にある蛍光性ベンゾフラザン化合物の分子間電子移動に由来することが確認された。この知見をもとに、蛍光性ベンゾフラザン化合物の置換基末端に芳香環を有する誘導体を合成し、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。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であることを明らかにした。

## 2. 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、この計算方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、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。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。

## 3. 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、既存の試薬よりも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、先に得られた  $\sigma_p$  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予測された。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 ( $0.989 \text{ eV}$ ) > NHAc ( $0.557$ ) > OMe ( $0.399$ ) > Me ( $0.106$ )、 $\Delta E (S_2-S_1)$  値は SMe ( $0.990 \text{ eV}$ ) > 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  $\Phi_f$  値が最も大きいと結論づけられた。以上より 4-mercapto-7-methylthio-2,1,3-benzoxadiazole (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。

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、各誘導体のみが顕著なピークとして検出され、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。

以上のように、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として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。またこの予測法に基付き開発した試薬 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、本研究の結果は、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が期待され、博士（薬学）の学位論文として十分な価値があるものと認めた。