

## 報 文

有機スズの3-ヒドロキシフラボンとの錯形成反応とその  
有機スズ蛍光定量への応用山田 真吉<sup>®\*</sup>, 浅野 稔浩\*, 會澤 宣一\*, 中村 基\*Complexation reaction of organotins with 3-hydroxyflavone and  
its application to their fluorometric determination

Shinkichi YAMADA, Toshihiro ASANO, Sen-ichi AIZAWA and Motoshi NAKAMURA\*

\*Faculty of Engineering, Shizuoka University, 3-5-1, Johoku, Hamamatsu-shi, Shizuoka 432-8561

(Received 12 January 1999, Accepted 5 February 1999)

The kinetics and thermodynamics of the complexation reactions of monophenyltin (MPT), dimethyltin (DMT), dibutyltin (DBT), diphenyltin (DPT), trimethyltin (TMT), tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) with 3-hydroxyflavone have been studied, and the results were applied to the fluorometric determination of organotins. The observed rate constant for the reactions hardly depended on the differences in the number and kind of organic substituent at tin. However, because the stability of the complexes was increased in the order MPT > DPT > TPT for phenyltins and DPT > DBT > DMT for di-substituted organotins, these differences were applied to the fluorometric determination of organotins. In the determination of the respective mono- and di-substituted organotins, MPT up to 5 μM, DMT up to 3 μM, DBT up to 4 μM and DPT up to 3 μM could be determined with a detection limit of 10, 20, 20 and 30 nM, respectively, and the tolerance level of tri-substituted organotins was relatively high. Noticeably, the presence of more than a 100-fold amount (by molarity) of TMT was successfully tolerated in the determination of 0.5 μM of any mono- or di-substituted organotin.

**Keywords :** complexation of organotins with 3-hydroxyflavone; fluorometric determination of organotins.

## 1 緒 言

有機スズ化合物は外因性内分泌攪乱物質として人体及び生態系への影響が危惧されている物質の一種であり、その毒性は有機置換基の数と種類に依存するとされている<sup>1)~3)</sup>。一方、ある種の有機スズ錯体には抗しゅよう(腫瘍)性を示すものがあり、錯体の安定度と抗腫瘍活

性度との相関が指摘されている<sup>4)</sup>。これらを考慮すると、有機スズの反応性に関する知見はこの化合物の人体及び生態系への影響を理解、考察する上で有用な情報を提供できることが期待できる。また、この知見を有機スズの微量分析へ応用することも可能である。そこで3-ヒドロキシフラボンを配位子に選び、有機スズとの錯体の安定性及び錯体の生成速度に及ぼす有機置換基の数と種類の効果を考察し、その結果の有機スズ蛍光定量への応用を検討した。

\* 静岡大学工学部: 432-8561 静岡県浜松市城北 3-5-1

Table 1 Spectral characteristics and formation constant of 1 : 1 complex

$R_2Sn$	Absorptiometry <sup>a)</sup>				Fluorometry <sup>b)</sup>				
	$\lambda_{\max}/$ nm	$\varepsilon/10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$	$\log K^H$	$\log K$	$\lambda_{\text{ex}}/$ nm	$\lambda_{\text{em}}/$ nm	$f^c$	$\log K^H$	$\log K$
DMT	400	1.28	$0.82 \pm 0.03$	$10.3 \pm 0.1$	400	458	1.21	$1.02 \pm 0.03$	$10.6 \pm 0.1$
DBT	400	1.57	$2.06 \pm 0.06$	$11.5 \pm 0.1$	403	458	1.00	$2.23 \pm 0.03$	$11.8 \pm 0.1$
DPT	400	1.87	$2.78 \pm 0.08$	$12.2 \pm 0.1$	400	446	18.4	$2.84 \pm 0.05$	$12.4 \pm 0.1$

a) Conditions:  $C_{\text{Sn}} = 0.2 \text{ mM}$ ;  $C_L = C_{\text{Sn}}/10$ ; methanol, 50%v/v; 25°C;  $I = 1 \text{ M}$ .

b) Conditions:  $C_{\text{Sn}} = 0.2 \text{ mM}$  (DMT, DBT), 0.02 mM (DPT);  $C_L = C_{\text{Sn}}/10$ ; methanol, 50%v/v; 25°C;  $I = 1 \text{ M}$ .

c) Relative to DBT complex.

3-ヒドロキシフラボンは有機溶媒中での有機スズの蛍光定量<sup>5)</sup>に用いられているモリン (2',3,4',5,7-ペンタヒドロキシフラボン) の母体化合物であり、カルボニル基酸素とプロトン解離したヒドロキシル基酸素を供与原子とする二座配位子として有機スズに配位すると考えられるので、明解な配位化学的解釈を可能にするためには極めて適した蛍光試薬である。なお、3-ヒドロキシフラボンによる有機スズの蛍光定量については二、三の報告があるが、ベンゼン<sup>6)</sup>やトルエン<sup>7,8)</sup>中の発色反応が利用されているだけで、錯体の安定性及び錯体の生成速度に関する知見は得られていない。

## 2 実験

### 2・1 試薬

三塩化フェニルスズ (Aldrich, 98%; 以下 MPT), 二塩化ジメチルスズ (和光純薬, 特級; 以下 DMT), 二塩化ジブチルスズ (和光純薬, 一級; 以下 DBT), 二塩化ジフェニルスズ (Aldrich, 96%; 以下 DPT), 塩化トリメチルスズ (Aldrich, 98%; 以下 TMT), 塩化トリブチルスズ (和光純薬, 一級; 以下 TBT), 塩化トリフェニルスズ (和光純薬; 以下 TPT) 及び 3-ヒドロキシフラボン (和光純薬, 特級; 以下 フラボン) をメタノールに溶解し、2.5 mM ストック溶液を調製した。メタノールは活性炭を加えて蒸留したものを、その他の試薬は特級品をそのまま用いた。

### 2・2 装置

蛍光スペクトル及び蛍光強度の測定には日立 F-3010 型分光蛍光度計を、吸収スペクトル及び吸光度の測定には島津 UV-3100 型自記分光光度計を用いた。蛍光強度の経時変化は、大塚電子 RA-401 型ストップトフロー分光光度計で追跡した。錯形成速度の解析には、大塚電子 RA-451 型データ処理装置を用いた。すべての反応溶

液の温度は循環恒温水槽及び恒温セルホルダーを用い 25 ± 0.1°C に保った。

### 2・3 実験操作

**2・3・1 フラボンの酸解離平衡** 20 μM のフラボンを含む溶液の吸光度及び蛍光強度の水素イオン濃度依存性を測定した。吸光度の測定にはプロトン付加型及び解離型の吸収極大波長 ( $\lambda_{\max}$ ) である 345 及び 400 nm を用い、蛍光強度の測定にはプロトン付加型の励起極大波長 ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) である 347 nm と蛍光極大波長 ( $\lambda_{\text{em}}$ ) である 517 nm を用いた。なお、プロトン解離型の  $\lambda_{\text{ex}}$  及び  $\lambda_{\text{em}}$  は 400 及び 444 nm であるが、蛍光強度はプロトン付加型のそれに比べ非常に小さい。溶液の水素イオン濃度は炭酸塩緩衝液で調節し、50%v/v のメタノールと 0.99 M の過塩素酸ナトリウムを含む 0.01 M の過塩素酸水溶液 ( $-\log[H^+] = 2.00$ ) を標準液に用い<sup>9)</sup>、Corning M-250 型 pH/ion analyzer で測定した。イオン強度は過塩素酸ナトリウムで 1 M に調節した。

**2・3・2 錯形成平衡** 有機スズ過剰の場合: 20 μM (蛍光法による DPT の場合は 2 μM) のフラボンに対して 10 倍モルの二置換有機スズを含む溶液の吸光度及び蛍光強度の水素イオン濃度依存性を測定した。吸光度の測定には、2・3・1 に示したプロトン付加型のフラボンの  $\lambda_{\max}$  と Table 1 に示したそれぞれの錯体の  $\lambda_{\max}$  を用いた。蛍光強度の測定には、Table 1 に示したそれぞれの錯体の  $\lambda_{\text{ex}}$  及び  $\lambda_{\text{em}}$  を用いた。溶液の水素イオン濃度は過塩素酸で調節し、2・3・1 に示した方法で測定した。イオン強度は過塩素酸ナトリウムで 1 M に調節した。フラボン過剰の場合: 2 μM の有機スズ、適量のフラボンと過塩素酸及び 50%v/v のメタノールを含む溶液について最大蛍光を発する錯体を生成する条件を検討した。蛍光強度の測定には、Table 2 に示したそれぞれの錯体の  $\lambda_{\text{ex}}$  及び  $\lambda_{\text{em}}$  を用いた。溶液の見掛けの pH は、JIS の

Table 2 Fluorescent characteristics and optimal conditions<sup>a)</sup>

R <sub>n</sub> Sn	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$C_L/10^{-4} \text{M}$	pH	$f^b)$
MPT	400	442	1.0	0.7	1.64
DMT	400	460	2.0	4.0	1.13
DBT	402	462	2.0	3.2	1.00
DPT	400	455	3.0	1.7	1.37

a) Conditions:  $C_{\text{Sn}} = 2 \mu\text{M}$ ; methanol, 50% v/v; 25°C.  
b) Relative to DBT complex.

標準液<sup>10)</sup>で校正した堀場 M-12 型 pH メーターで測定した。

**2・3・3 錯形成速度** 有機スズ溶液として、4 μM の各有機スズ、適当量の過塩素酸及び 50% v/v のメタノールを含む溶液を調製した。フラボン溶液として、Table 2 に示した最適濃度の 2 倍モルのフラボン、有機スズ溶液と同量の過塩素酸及びメタノールを含むフラボン溶液を調製した。これら 2 種類の溶液をストップトフロー分光光度計のミキサーにより体積比 1:1 で混合した。Table 2 に示した波長で励起し、460 nm のカットフィルターを用いた全蛍光の経時変化を自動記録して反応を追跡した。反応溶液の見掛けの pH は 2・3・2 のフラボン過剰の場合に示した方法で測定した。

### 3 結果と考察

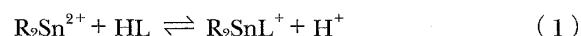
#### 3・1 フラボンの酸解離平衡

フラボンは弱アルカリ性で 286, 367 及び 453 nm に等吸収点を持つ紫外吸収スペクトル変化を与えた。このスペクトル変化をフラボンの酸解離平衡に帰属し、吸光度及び蛍光強度の水素イオン濃度依存性を最小二乗法で解析した。その結果、フラボンの  $pK_a$  値として 345 及び 400 nm での吸光度測定から  $9.43 \pm 0.04$  及び  $9.46 \pm 0.01$  を、517 nm での蛍光強度測定から  $9.55 \pm 0.05$  を得た。蛍光法では励起状態での酸解離平衡に対する値が得られる場合があるが<sup>11)</sup>、今回得られた値は吸光度法による値とほぼ一致していることより、基底状態での酸解離平衡に対する値と考えられる。

#### 3・2 1:1 錯体生成平衡

フラボンに対して各有機スズが 10 倍モル共存する条件下で生成する 1:1 錯体のスペクトル特性及び生成定数に及ぼす有機置換基の効果を、二置換有機スズについて検討した。弱酸性で生成する錯体は DMT の場合は 282 及び 365 nm に、DBT の場合は 284 及び 366 nm に、

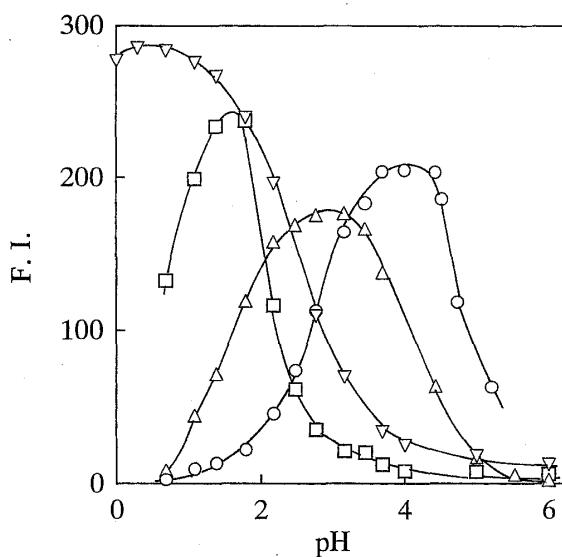
DPT の場合は 285 及び 365 nm に等吸収点を持つ紫外吸収スペクトル変化を与えた。このスペクトル変化を



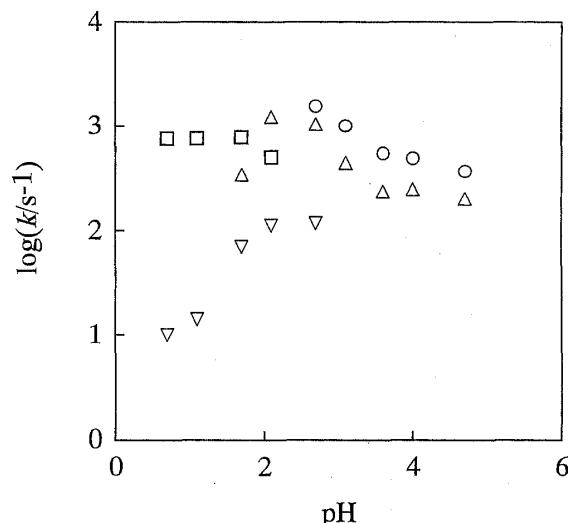
の錯形成平衡に帰属し、吸光度及び蛍光強度の水素イオン濃度依存性を最小二乗法で解析し、式(1)の平衡定数  $K^{\text{H}} = [\text{R}_2\text{SnL}^+][\text{H}^+]/([\text{R}_2\text{Sn}^{2+}][\text{HL}])$  を求めた。得られた  $K^{\text{H}}$  値、錯体のモル吸光係数  $\epsilon$ 、錯体 1 M 当たりの蛍光強度  $f$  の相対値及び  $K = [\text{R}_2\text{SnL}^+]/([\text{R}_2\text{Sn}^{2+}][\text{L}^-]) = K^{\text{H}}/K_a$  で定義される 1:1 錯体の生成定数を Table 1 に示す。錯体の  $\lambda_{\text{max}}$  には置換基の違いによる差が見られないとともに、その値はプロトン解離型フラボンの  $\lambda_{\text{max}}$  と一致した。錯体の  $\epsilon$  は錯体の安定度が大きくなるに伴い大きくなつた。錯体の  $\lambda_{\text{ex}}$  は  $\lambda_{\text{max}}$  とほぼ一致し、他の二者に比べ強い蛍光を発する DPT 錯体の  $\lambda_{\text{em}}$  には短波長シフトが見られた。蛍光法で求めた  $K^{\text{H}}$  値のほうが若干大きいが、有意の差として議論すべき程度ではないと判断した。有機スズの加水分解定数  $K_h = [\text{R}_2\text{SnOH}^+][\text{H}^+]/[\text{R}_2\text{Sn}^{2+}]$  の対数値が、DMT では  $-3.12$ <sup>12)</sup>, DBT では  $-2.9 \sim -2.4$ <sup>12)</sup> (いずれも水溶液, 25°C, イオン強度 3 M), DPT では  $-2.0$ <sup>13)</sup> (水溶液, 25°C, イオン強度 1.0 M) であることを考慮すると、安定なヒドロキソ錯体を生成する有機スズほどフラボン錯体の生成定数を大きくすることが分かる。これは、置換基の電子吸引性がスズ上の電子密度を減少させ、スズとヒドロキソ酸素との結合を強める要因になるためと考えられる。

#### 3・3 過剰のフラボンとの錯形成平衡

2 μM の MPT, DMT, DBT, DPT, TMT, TBT 及び TPT とフラボンとの錯形成平衡をフラボン大過剰の条件で検討したところ、いずれの三置換有機スズについても蛍光性錯体の生成は認められなかった。上記の一及び二置換有機スズについて錯体の蛍光強度に及ぼす pH 及びフラボン濃度の影響を検討し、Table 2 に示す結果を得た。二置換有機スズ 1:1 錯体と比較すると、フラボン大過剰の条件で生成する錯体の蛍光特性には以下の特徴が認められた:(1)  $\lambda_{\text{ex}}$  はほぼ一致している、(2)  $\lambda_{\text{em}}$  に若干の長波長シフトが見られる、(3) DPT 錯体の蛍光強度が相対的にかなり低下している。また、DPT 錯体よりも MPT 錯体のほうが強い蛍光を発することも特徴的である。Fig. 1 に示した錯体の蛍光強度 (F.I.) に及ぼす pH の影響から判断すると、フラボン大過剰の条件で生成する錯体の安定度の順序は MPT > DPT >



**Fig. 1** Effect of pH on the fluorescence intensity of organotin complexes with 3-hydroxyflavone  
Organotins: MPT ( $\nabla$ ); DMT ( $\circ$ ); DBT ( $\triangle$ ); DPT ( $\square$ ). The conditions are the same as those in Table 2.



**Fig. 2** Effect of pH on the observed rate constant for the reactions of organotins with 3-hydroxyflavone

The conditions except pH and symbols are the same as those in Table 2 and Fig. 1, respectively.

**Table 3** Effect of diverse organotins on the determination of 0.5  $\mu\text{M}$  of respective organotins

$\text{R}_n\text{Sn}$	Tolerance ratio ([diverse organotin]/[ $\text{R}_n\text{Sn}$ ])						
	MPT	DMT	DBT	DPT	TMT	TBT	TPT
MPT	—	14	10	0.2	100 <sup>a)</sup>	100 <sup>a)</sup>	30
DMT	0.6	—	0.05	1	100 <sup>a)</sup>	10	50
DBT	0.06	0.08	—	0.1	100 <sup>a)</sup>	8	10
DPT	0.04	2	0.1	—	100 <sup>a)</sup>	10	10

a) Maximum ratio examined.

DBT > DMT となる。二置換有機スズについては、この順序は 1:1 錯体のそれと一致している。水素イオン濃度 (pH) の測定法とイオン強度調節の有無に違いがあるので厳密な議論はできないが、Table 1 の  $K^{\text{H}}$  値を用いると Fig. 1 に示した pH の上昇に伴う DMT 及び DBT 錯体の蛍光強度の増加は 1:1 錯体の生成で説明できる。

#### 3・4 錯形成速度

Fig. 1 の結果を基に、最大蛍光を発する錯体を生成する pH 前後で錯形成に伴う蛍光強度の経時変化を測定、解析した。すべての反応曲線は擬一次で解析できた。得られた見掛けの条件速度定数 ( $k$ ) の pH 依存性を Fig. 2 に示す。有機スズの加水分解平衡、フラボン濃度の違

い及び錯体解離反応の寄与等を考慮しなければ厳密な比較はできないが、有機置換基の種類に起因する速度差を二置換有機スズに期待するのは難しそうである。有機置換基の数に起因する速度差がフェニルスズについて認められたが、その差が大きくなる低 pH では Fig. 1 に示したように蛍光性錯体の生成平衡にもかなりの差がある。これらの理由で、有機スズの定量に錯形成速度の差は利用しないこととした。

#### 3・5 有機スズの蛍光定量

3・4 で述べた理由から、錯形成平衡の差を利用する各有机スズの蛍光定量について検討した。

**3・5・1 検量線** Table 2 に示した最適条件で作成した検量線から各有机スズの定量範囲を求めた。なお、

検出限界は検量線の切片の標準偏差の3倍で定義した。その結果, MPTについては検出限界10 nMで5 μMまで, DMTについては検出限界20 nMで3 μMまで, DBTについては検出限界20 nMで4 μMまで, DPTについては検出限界30 nMで3 μMまでの定量が可能であった。また, 生成した錯体の蛍光強度は, 少なくとも2時間は一定であった。

**3・5・2 異種有機スズの影響** 0.5 μMのMPT, DMT, DBT及びDPTそれぞれの定量に及ぼす異種有機スズの影響を検討した。なお, ±5%を超える誤差を与えない場合を許容とした。その結果をTable 3に示す。いずれの有機スズの定量にも三置換有機スズは約10倍モル以上の共存が可能であり, TMTに至っては100倍モル以上の共存が可能であった。二置換有機スズ間で比較すると, DMTの定量に対するDBT, DBTの定量に対するDMTの共存許容量が少ない。そこで, pHをTable 2に示した最適pHから移動させることで共存許容量の向上を検討した。その結果, DMTの定量pHを4から5に移動させることにより, 感度は15%程度低下するもののDBTの共存許容量を0.2倍モルまで, DBTの定量pHを3.2から1.8に移動させることに

より, 感度は10%程度低下するもののDMTの共存許容量を0.4倍モルまで向上できた。

## 文 献

- 1) 今枝一男, 大沢敬子, 内山一美: ぶんせき (*Bunseki*), **1991**, 131.
- 2) 森田昌敏: ぶんせき (*Bunseki*), **1991**, 785.
- 3) 堀口敏宏: ぶんせき (*Bunseki*), **1997**, 1014.
- 4) M. M. Shoukry: *Talanta*, **43**, 177 (1996).
- 5) Y. Arakawa, O. Wada, M. Manabe: *Anal. Chem.*, **55**, 1901 (1983).
- 6) F. Vernon: *Anal. Chim. Acta*, **71**, 192 (1974).
- 7) S. J. Blunden, A. H. Chapman: *Analyst (London)*, **103**, 1266 (1978).
- 8) W. N. Aldridge, B. W. Street: *Analyst (London)*, **106**, 60 (1981).
- 9) S. Yamada, K. Ohsumi, M. Tanaka: *Inorg. Chem.*, **17**, 2790 (1978).
- 10) JIS Z 8802, pH測定方法 (1964).
- 11) E. L. Wehry, L. B. Rogers: "Fluorescence and Phosphorescence Analysis", Edited by D. M. Hercules, (1966), (Interscience, New York).
- 12) R. S. Tobias, H. N. Farrer, M. B. Hughes, B. A. Nevett: *Inorg. Chem.*, **5**, 2052 (1966).
- 13) G. Pilloni: *Anal. Chim. Acta*, **37**, 497 (1967).

## 要 目

モノフェニルスズ(MPT), ジメチルスズ(DMT), ジブチルスズ(DBT), ジフェニルスズ(DPT), トリメチルスズ(TMT), トリブチルスズ(TBT)及びトリフェニルスズ(TPT)と3-ヒドロキシフラボンとの蛍光性錯体生成反応の平衡と速度を検討し, その結果を有機スズの蛍光定量に応用了。錯体の生成速度は有機置換基の数と種類にはほとんど依存しなかつたが, 錯体の安定性には, フェニルスズについてはMPT>DPT>TPT, 二置換有機スズについてはDPT>DBT>DMTの差が見られたので, この差を有機スズの蛍光定量に利用した。各々の有機スズの定量においては, 検出限界10 nMで5 μMまでのMPT, 検出限界20 nMで3 μMまでのDMT, 検出限界20 nMで4 μMまでのDBT, 検出限界30 nMで3 μMまでのDPTの定量が可能であった。いずれの一置換及び二置換有機スズの定量においても三置換有機スズの共存許容量は相対的に大きく, TMTについては100倍モル以上の共存が許容された。