

新規変色型蛍光色素を用いた水サンプル中重金属イオンの簡易分析

北海道大学大学院工学院 学生会員 ○羽深 昭, 谷山 拓生

北海道大学大学院地球環境科学研究院 非会員 山田 幸司

北海道大学大学院工学研究院 正会員 高橋 正宏, 岡部 聡, 佐藤 久

1. はじめに

重金属による土壌・地下水汚染が問題となっており, 人の健康ならびに生態系への影響が懸念されている¹⁾. 現在, 重金属汚染現場でのモニタリングやスクリーニングを目的とした簡易分析法が求められており, パックテスト, イオン選択性電極ならびにボルタンメトリー法などが開発されている. 本研究ではこれらの方法の欠点を解決するために, 蛍光分光法による新たな簡易分析法を開発することを試みている. 蛍光分光法は高感度かつ簡易な分析法であり, 分析機器の構成要素も少ないため, 装置の小型化も可能である²⁾. しかしながら, 蛍光分光法を用いた重金属の分析には, 重金属イオンを検出し, 蛍光特性(蛍光強度, 波長)が変化する蛍光色素が必要である. このような蛍光色素は既に多数の報告があるが, その多くが生命科学分野での利用を目的としており, 環境中の重金属を分析するための蛍光分光法は実用化されていない. これは含水サンプル中では色素が凝集し, 蛍光消光してしまうためである.

本研究グループではこれまでに 2 種類の新規蛍光色素を開発しており³⁾, これらが特に Zn^{2+} に対して親和性が高かったことを明らかにしている. 開発した蛍光色素は重金属イオンと錯体を形成すると蛍光極大波長が移動したことから, 重金属イオンをレシオメトリー測定により定量できる可能性が示唆された. レシオメトリー測定とは, 異なる 2 波長の強度比を利用した定量法であり, 色素の退色, 光源強度変動などの影響がないため, 単一波長の強度測定と比較して定量性が高い.

本研究グループでもこれまでは有機溶媒であるアセトニトリル中でのみ色素の特性評価を行ってきたが, 環境水サンプルへの適用を見据え, 本研究では, 含水アセトニトリル中での色素の特性評価を試みた. 具体的には, 水を 10% 含む含水アセトニトリル中で吸収および蛍光スペクトルを測定し, アルカリ金属イオンおよびアルカリ土類金属イオンの妨害, pH の影響を検討した.

2. 実験方法

分光蛍光光度計(日本分光, FP-6600)により蛍光色素

の蛍光スペクトル測定を行った⁴⁾. 溶媒には含水アセトニトリル(アセトニトリル/水=9/1, Tris-HCl = 0.01 M, pH 7)を用いた. Zn^{2+} 溶液は過塩素酸亜鉛を用いて調製した. 蛍光色素 1 および 2³⁾ の濃度を 1 μM と一定とし, 亜鉛イオン濃度を変化させスペクトル測定を行った⁴⁾.

3. 結果および考察

2 種類の新規変色型蛍光色素は含水アセトニトリル中において凝集することなく蛍光を発した. 蛍光色素 1 および 2 はアセトニトリル中では Mg^{2+} および Ca^{2+} に応答し,

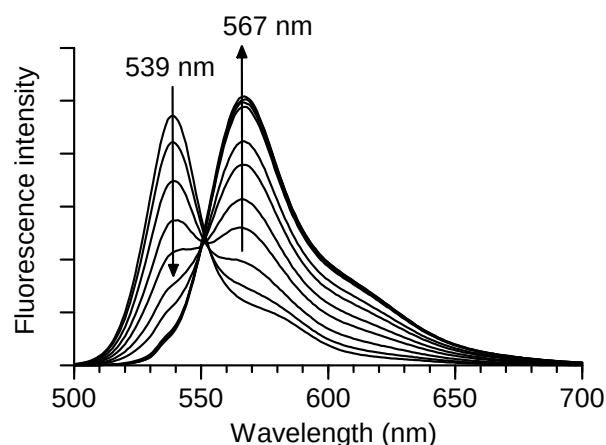


図 1. Zn^{2+} (0 – 50 μM) の濃度変化に伴う色素 1 (1 μM) の蛍光スペクトル変化 (励起波長: 535 nm)

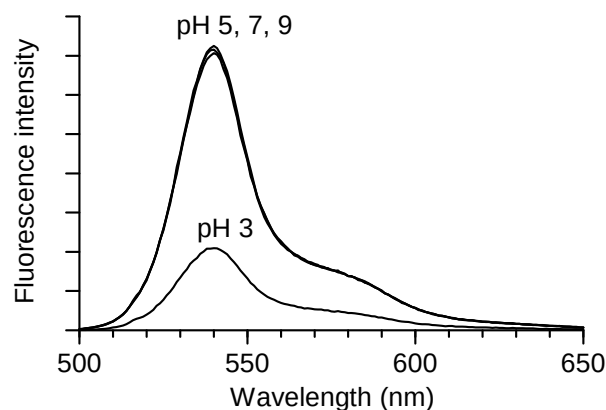


図 2. 色素 1 (2 μM) の蛍光スペクトルへの pH 影響 (励起波長: 515 nm)

キーワード 重金属, 蛍光分光法, 蛍光色素, 水サンプル, 妨害イオン, pH

連絡先 〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目 北海道大学大学院工学研究院 TEL: 011-706-6277

蛍光スペクトルに変化が生じたが、含水アセトニトリル中ではこれら 2 つのイオンに応答しなかった。これは Mg^{2+} および Ca^{2+} が水和し、色素と結合しなかったためだと考えられる。なお、 Na^+ および K^+ はどちらの溶媒中においても色素 **1** および **2** に影響を与えなかった。

蛍光色素 **1** ($1 \mu M$) に対して、 Zn^{2+} 濃度を 0 から 50 当量 ($0 - 50 \mu M$) まで増加させた際の蛍光スペクトル変化を図 1 に示す。色素 **1** の蛍光極大波長は 539 nm であった。色素 **1** が Zn^{2+} と錯体を形成すると、蛍光極大波長が 567 nm へ長波長移動した。また、 Zn^{2+} 濃度の増加に伴い 2 波長の蛍光強度は変化し、 539 nm での蛍光強度が減少し、 567 nm での蛍光強度が増加した。次に色素 **1** に対する pH の影響を検討した。pH に依らず色素 **1** の蛍光極大は 539 nm に見られたが、pH 3 では蛍光強度が低下した (図 2)。これは色素の配位子部位である N 原子上の非共有電子対にプロトンが付加したためと考えられる。

蛍光色素 **2** に関しても色素 **1** と同様に蛍光滴定実験を行った。色素 **2** ($1 \mu M$) に対して、 Zn^{2+} 濃度を 0 から 500 当量 ($0 - 500 \mu M$) まで増加させた際の蛍光スペクトル変化を図 3 に示す。色素 **2** は 591 nm 付近に弱い蛍光を示した。色素 **2** が Zn^{2+} と錯体を形成すると、蛍光極大波長が 546 nm へ短波長移動した。 Zn^{2+} 濃度の増加に伴い 546 nm の蛍光強度が増加し、 606 nm に等蛍光点がみられた。つづいて色素 **2** に対する pH の影響を検討した。pH 5, 7 および 9 では色素 **2** の蛍光スペクトルに変化はみられなかったが、pH 3 では蛍光極大波長が 566 nm へ短波長移動し、強度が増加した (図 4)。この理由としても、色素 **1** と同様に配位子部位の N 原子がもつ非共有電子対にプロトンが付加したことが考えられる。

図 1 および図 3 に示した蛍光スペクトルから、蛍光色素 **1** および **2** に関して 2 波長の蛍光強度比 (R) を算出し (色素 **1**: F_{567}/F_{539} , 色素 **2**: F_{546}/F_{606})、 Zn^{2+} 濃度に対してプロットすることで検量線を得ることができた (図 5)。蛍光色素 **1** および **2** の Zn^{2+} 検出範囲はそれぞれ 0.007 mg/L から 1.3 mg/L 、 0.13 mg/L から 330 mg/L であった。

以上の結果から、色素 **1** は Zn^{2+} に対する結合力が強く、より低濃度の Zn^{2+} を定量することが可能である。一方色素 **2** は Zn^{2+} との結合力が色素 **1** ほど強くなく、結果として検出限界は色素 **1** より高いものの、より高濃度の Zn^{2+} を広範囲で定量可能であるといえる。

4. 結論

2 種類の新規変色型蛍光色素は含水アセトニトリル中において凝集することなく蛍光を発した。また、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 K^+ ならびに Ca^{2+} は色素 **1** および **2** のスペクトルに

影響を与えなかった。また、2 種類の色素を用いてレシオメトリー測定により Zn^{2+} を定量することができた。色素の種類によりスペクトル応答が異なり、 Zn^{2+} の定量範囲が異なることが分かった。

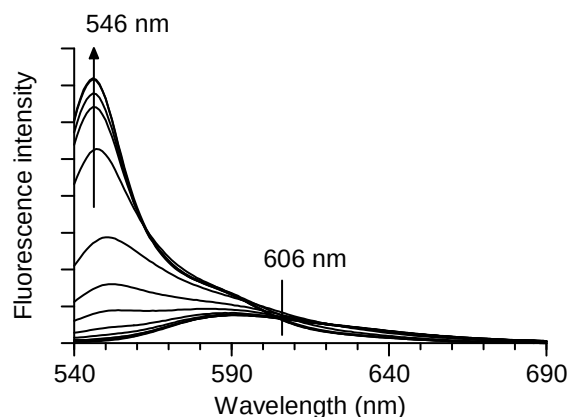


図 3. Zn^{2+} ($0 - 500 \mu M$) の濃度変化に伴う色素 **2** ($1 \mu M$) の蛍光スペクトル変化 (励起波長: 535 nm)

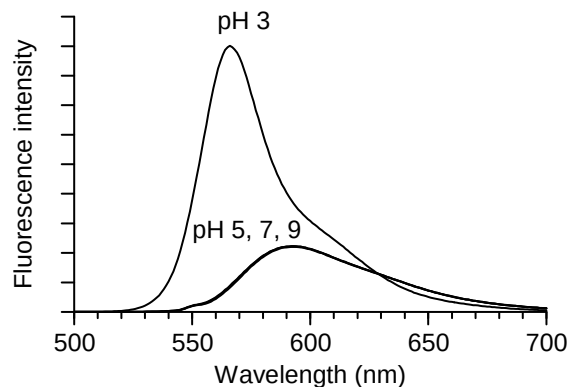


図 4. 色素 **2** ($2 \mu M$) の蛍光スペクトルへの pH 影響 (励起波長: 550 nm)

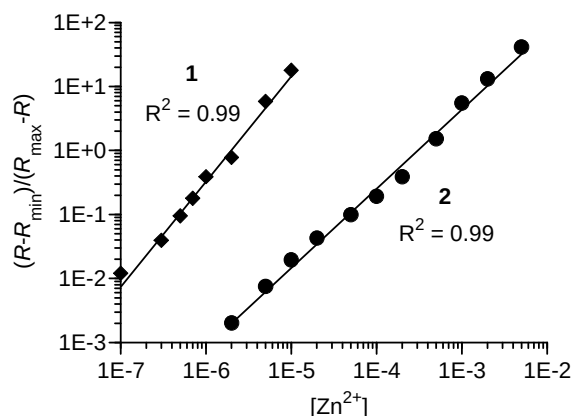


図 5. Zn^{2+} に対する色素 **1** および **2** の検量線

謝辞：本研究を遂行するにあたり CREST および科研費 (23686074) の支援を受けました。ここに記し謝意を表します。

参考文献

- 1) Verma, N.; Singh, M. *BioMetals*. **2005**, *18*, 121–129.
- 2) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- 3) 谷山ら, 2011, 第 45 回日本水環境学会年会講演集
- 4) 羽深ら, 2011, 第 45 回日本水環境学会年会講演集