

新規蛍光色素を用いた重金属イオン分析

Heavy metal ion analysis by using novel fluorescent sensor molecules

北海道大学大学院工学院 学生会員 ○羽深昭 (Akira Hafuka), 谷山拓生 (Hiroki Taniyama)

北海道大学大学院工学院 非会員 菅藤亮輔 (Ryosuke Kando)

北海道大学大学院工学部 非会員 吉川弘晃 (Hiroaki Yoshikawa)

北海道大学大学院地球環境科学研究院 非会員 山田幸司 (Koji Yamada)

北海道大学大学院工学院 正会員 高橋正宏 (Masahiro Takahashi), 岡部聡 (Satoshi Okabe), 佐藤久 (Hisashi Satoh)

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、バックテスト、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。本研究グループ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。

本研究グループではこれまでに4種類の新規蛍光色素を開発した³⁾。これら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することから、重金属イオンをレシオメトリー測定により定量できる。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、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²⁾。

本研究グループでは、これまでに有機溶媒であるアセトニトリル中で色素の特性評価を行ってきたが、将来的な環境サンプルへの適用を考え、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。

2. 実験方法

2.1 蛍光色素の合成

Figure 1 に新規蛍光色素 1 の分子構造を示す。蛍光色素の合成は原料化合物より段階的に行い³⁾、各反応での目的化合物は抽出

後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーまたはアルミナカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。全ての新規化合物は¹H-NMR スペクトル、¹³C-NMR スペクトルおよびMS スペクトルにより同定した。

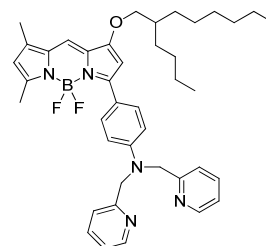


Figure 1. Chemical structure of fluorescent sensor molecule 1.

2.2 吸収および蛍光スペクトル測定

蛍光色素溶液は 3.0×10^{-7} mol の蛍光色素を 10 mL のアセトニトリルに溶解する事で作製した。金属イオン標準原液は 13 種類の金属 (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} および Pb^{2+}) の過塩素酸塩を Tris-HCl バッファー (1 mM) に溶かして作製した。10 mL メスフラスコに色素溶液と金属標準液を分注し、目的の金属濃度の試料を調製した。すなわち、溶媒はアセトニトリル/水=9/1 の含水アセトニトリルである。吸収および蛍光スペクトルは紫外可視分光光度計 (日本分光, V-630) および分光蛍光光度計 (日本分光, FP-6600) を用いて測定した。

3. 結果および考察

Figure 2 に重金属イオン溶液 (500 μM) と蛍光色素 1 溶液 (1 μM) の混合液の蛍光スペクトルを示した。蛍光色素 1 自身は 592 nm に弱い蛍光を示した。溶液中に Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} または Hg^{2+} を加えると、蛍光スペクトルが短波長側へ移動した。金属イオン種によってスペクトル移動による応答が2通りに分かれた。

Zn^{2+} および Cd^{2+} を添加すると蛍光極大波長が大きく短波長移動し (548 nm), 蛍光強度も増大した. Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} および Hg^{2+} は Zn^{2+} ならびに Cd^{2+} と比較するとスペクトルの移動幅が小さく (蛍光極大波長 566 nm), 蛍光強度も低かった. なお, アルカリ金属イオンおよびアルカリ土類金属イオンには応答しなかったため, これらイオンによる妨害は受けないといえる. ブラックライト照射時, 蛍光色素 **1** の溶液は赤紫色の蛍光を発したが, Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} または Hg^{2+} 添加後には黄色, Zn^{2+} または Cd^{2+} 添加後には黄緑色とそれぞれ蛍光色が変わった.

上記の金属イオンを用い競合実験を行った結果, 蛍光色素 **1** は Cr^{3+} に優先的に結合することが明らかとなった. そこで Cr^{3+} を用いて蛍光滴定実験を行った. 蛍光色素 **1** の濃度を $1\ \mu\text{M}$ に固定し, Cr^{3+} 濃度を $0\ \mu\text{M}$ から $500\ \mu\text{M}$ (500 当量) まで徐々に増加させた際の蛍光スペクトル変化を Figure 3 に示した. Cr^{3+} 濃度の増加に伴い, 色素と Cr^{3+} との錯体が発する波長 $566\ \text{nm}$ での蛍光強度は増強した. また, Cr^{3+} 濃度に依らず $648\ \text{nm}$ の蛍光強度は一定であった (等蛍光点). つまり, この2波長での蛍光強度 (F) の比 ($R = F_{566}/F_{648}$) は Cr^{3+} 濃度の増加に従って増大する. Figure 4 に R 値の比を用いて作成した検量線を示した. 色素 **1** と Cr^{3+} との結合定数は $1.89 \times 10^5\ \text{M}^{-1}$ であり, Cr^{3+} 定量範囲は $0.16 - 5.20\ \text{mg/L}$ ($3.0 \times 10^{-6} - 100.0 \times 10^{-6}\ \text{M}$) であった.

4. 結論

新規蛍光色素 **1** は金属イオンである Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} および Hg^{2+} に応答し, 蛍光スペクトルが短波長側へ移動した. また金属イオン種によってスペクトル応答に違いが見られた. 競合実験の結果, 色素 **1** は Cr^{3+} に対し最も親和性が高いことが明らかとなった. Cr^{3+} を用いて蛍光滴定実験を行った結果, 色素 **1** は Cr^{3+} 濃度の増加に伴い, $566\ \text{nm}$ の蛍光強度が増加し, $648\ \text{nm}$ の強度は変化しないレシオメトリック型の蛍光スペクトル変化を示した. この2波長の R 値を用いてレシオメトリ測定を行った結果, 良好な Cr^{3+} 検量線を得ることができた. 色素 **1** と Cr^{3+} との結合定数は $1.89 \times 10^5\ \text{M}^{-1}$ であり, Cr^{3+} 濃度の定量範囲は $0.16 - 5.20\ \text{mg/L}$ ($3.0 \times 10^{-6} - 100.0 \times 10^{-6}\ \text{M}$) であった. 今後は本研究で開発した蛍光色素を用いて実際の環境サンプルの分析を行いたいと考えている.

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) 菅藤ら, 2011, 第 48 回環境工学研究フォーラム講演集 p 220.

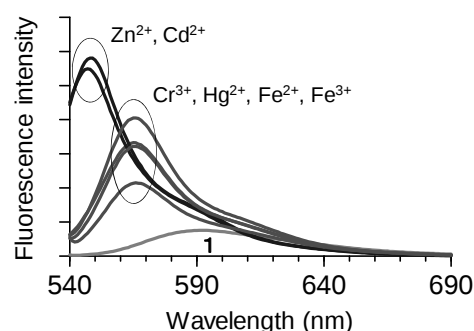


Figure 2. Fluorescence spectra of fluorescent sensor molecule **1** ($1\ \mu\text{M}$) in the presence of different metal cations ($500\ \mu\text{M}$) in Tris-HCl ($1\ \text{mM}$, pH 7.0) solution (acetonitrile/water = 9/1, v/v). The excitation wavelength was at $535\ \text{nm}$.

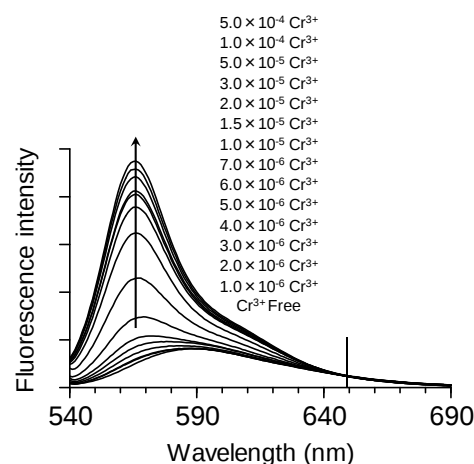


Figure 3. Changes in the fluorescence emission spectra of fluorescent sensor molecule **1** to Cr^{3+} . Spectra shown are for Cr^{3+} of 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0, 50.0, 100.0, and $500.0\ \mu\text{M}$. Spectra were acquired in Tris-HCl ($1\ \text{mM}$, pH 7.0) solution (acetonitrile/water = 9/1, v/v) with excitation at $535\ \text{nm}$. The concentration of fluorescent sensor molecule **1** was $1\ \mu\text{M}$.

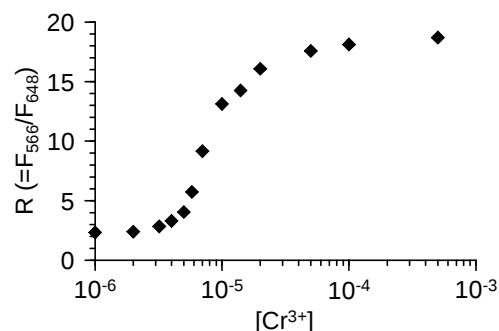


Figure 4. Plot of fluorescence intensity ratio ($R = F_{566}/F_{648}$) of fluorescent sensor molecule **1** versus increasing concentration of Cr^{3+} .