

新規蛍光分子プローブを用いた環境水中重金属イオン分析

Analysis of Heavy Metal Ion in Environmental Water by Novel Fluorescent Probe

北海道大学工学院
北海道大学工学院
北海道大学工学院
北海道大学工学部
北海道大学大学院工学研究院
北海道大学大学院工学研究院

吉川弘晃 (Hiroaki Yoshikawa)
羽深 昭 (Akira Hafuka)
菅藤亮輔 (Ryosuke Kando)
大屋光平 (Kohei Oya)
高橋正宏 (Masahiro Takahashi)
正 員 ○佐藤 久 (Hisashi Satoh)

1. はじめに

近年、土壌や地下水の重金属汚染に対し社会的関心が高まり、基準や規制の見直しが行われている。例えば、亜鉛の排水基準は水道水や農業用水の基準をもとに 5 mg/L と定められていたが、平成 15 年に環境基準が設定されたことを受けて平成 18 年に 2 mg/L に見直された¹⁾。水道水質基準は逐次改正され、平成 22 年には「カドミウム及びその化合物」にかかわる水質基準が 0.003 mg/L 以下に強化された²⁾。雨天時における路面排水には晴天時に路面に堆積した道路塵埃が含まれ、それらには都市交通由来の重金属が含まれる。したがって、路面排水は都市域におけるノンポイント汚染源の一つであり、路面排水に含まれる重金属によって河川水の汚染が引き起こされる可能性がある³⁾。このような基準の強化に伴い、汚染サイトの検出数は急増している。地下水や土壌重金属汚染のリスクがある場所としては、廃棄物埋め立て処理場、鉱山廃水、掘削ずりなどが対象としてあげられる。今後、基準や規制の見直しにより、これらの汚染サイトの数は増加することが予想されており⁴⁾、重金属分析の需要は増大すると考えられる。

重金属分析の公定法には AAS (フレイム原子吸光分光法) や ICP-AES (誘導結合プラズマ発光分光分析法) が利用されている。これら機器分析法は、分析精度が高いものの、前処理に時間と労力を要し、分析コストが高く、熟練した技術が必要である。重金属汚染の早期発見や未然防止のためには、簡易に、低コストで、オンサイトで重金属を分析可能な技術の開発が必要不可欠である。簡易な分析法としてボルタンメトリーが使用されている。しかしながら、ボルタンメトリー法は作用電極表面が汚染されるため寿命が短い、参照電極が必要であるため小型化が難しい、夾雑物質の影響が大きいなどの問題点がある。

この問題を解決する分析法として我々は蛍光分光法に着目した。蛍光分光法は吸光光度法より高感度な分析法

である。また、簡易な分析法であり、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⁵⁾。蛍光分光法を用いた重金属分析には、重金属イオンに応答する蛍光色素の開発が必要である。本研究では新規蛍光分子プローブ(BDP-TPY)を開発し、環境水の一つである路面排水中に含まれる Zn^{2+} の定量を試みた。

2. 実験方法

(1) 新規蛍光分子プローブの応答性評価

10 mL のメスフラスコ中に、Tris-HCl 緩衝液で作製した重金属イオン標準液を 1 mL、濃度 40 μ M で新規蛍光分子プローブを溶解させたアセトニトリル溶液を 0.25 mL、アセトニトリルを 8.75 mL を加えた (水/アセトニトリル比は 1/9)。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、この混合溶液の吸収および蛍光スペクトルを測定した。重金属イオン溶液は 13 種類の金属イオン (Na^+ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} ならびに Pb^{2+}) の過塩素酸塩を用いて調整した。pH は Tris-HCl 緩衝液を用いて 7.0 に調整した。溶媒はすべて分光分析用のものを用いた。

(2) 路面排水中の Zn^{2+} 定量

路面排水は雨天時に大阪、茨城、岐阜および広島の前線道路と高速道路から採取した。10 mL のメスフラスコ中に、孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルター (ADVANTEC ; DISMIC-25AS) によりろ過した路面排水を 4.5 mL、20 mM Tris-HCl 緩衝液を 0.5 mL、上述の蛍光色素溶液を 0.25 mL、アセトニトリルを 4.75 mL 加えた (水/アセトニトリル比は 1/1)。検量線は路面排水の代わりに Zn^{2+} 標準溶液を添加することで作成した。試料調整後、吸収および蛍光スペクトルを測定した。 Zn^{2+} 標準溶液と路面排水中の金属 (Al、B、Ca、Cd、Cr、Cu、Fe、

Mg、Mn、Ni、Ni、Pb、Sb、Zn) 濃度をICP-AES (島津製作所; ICPE-9000) にて測定した。路面排水中の溶存有機物濃度 (DOC) を全有機体炭素計 (島津製作所、TOC-V_{CSH}) を用いて測定した。

3. 結果および考察

(1) 新規蛍光分子プローブの応答性評価

新規蛍光分子プローブのイオン選択性について検討した。プローブ溶液 (1 μM) に13種類の金属イオン (Na⁺、Mg²⁺、K⁺、Ca²⁺、Cr³⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺、Hg²⁺ならびにPb²⁺) をそれぞれ加えた。プローブにZn²⁺、Cd²⁺、Hg²⁺を添加した場合、蛍光スペクトルが変化した (図1)。プローブにNa⁺、Mg²⁺、K⁺、Ca²⁺、Cr³⁺、Mn²⁺、Fe³⁺、ならびにPb²⁺を添加した場合、蛍光スペクトルは変化しなかった。この結果から、プローブはこれらイオンの妨害を受けない事が明らかとなった。Cu²⁺とFe²⁺によりプローブの蛍光は消光した。続いて、6種類の金属イオン (Na⁺、Mg²⁺、K⁺、Ca²⁺、Cd²⁺、Hg²⁺) を含む溶液に最終濃度が10 μMとなるようにZn²⁺を加え蛍光スペクトルを測定したところ、Zn²⁺のみの溶液に対応する蛍光スペクトル (図1中のZn²⁺)と同様となった。この結果から、プローブがZn²⁺に選択的に応答することが明らかとなった。

(2) 新規蛍光分子プローブに対するpH影響

新規蛍光分子プローブに対するpHの影響を検討した (図2)。プローブの蛍光極大波長はpHに依らずプローブ由来の539 nmであった。pH5.0から9.0では蛍光強度はほぼ一定であったが、pH5.0以下では蛍光強度が低下した。これはプローブのイオン配位子部位のN原子の非共有電子対にプロトンが配位結合したためと考えられる。

(3) 路面排水中のZn²⁺濃度の定量

新規蛍光分子プローブを用いてZn²⁺蛍光滴定実験を行った。プローブの濃度を1 μMとし、Zn²⁺濃度を0 μMから50 μM (50当量) まで徐々に増加させた。Zn²⁺濃度の増加に伴い、プローブ由来の波長 (539 nm) の蛍光強度が徐々に低下し、その一方でプローブのZn²⁺との錯体由来の蛍光強度 (波長567 nm) が徐々に増加した (図3)。この2波長の蛍光強度 (F) の比 ($R = F_{567}/F_{539}$) の対数値をZn²⁺濃度に対してプロットした結果、Zn²⁺濃度が1から50 μM (65.38から3269 μg/L) の範囲で得られた (図4)。検出限界は0.244 μM (16 μg/L)、定量限界は

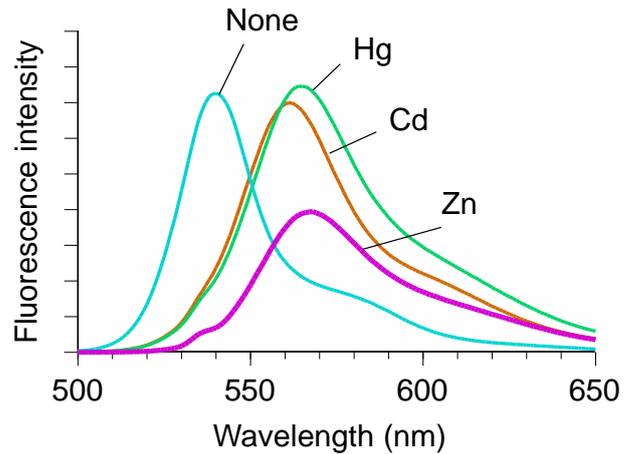


図1 重金属イオン (10 μM) による新規蛍光分子プローブ (1 μM) の蛍光スペクトル変化 (λ_{ex}=535 nm)

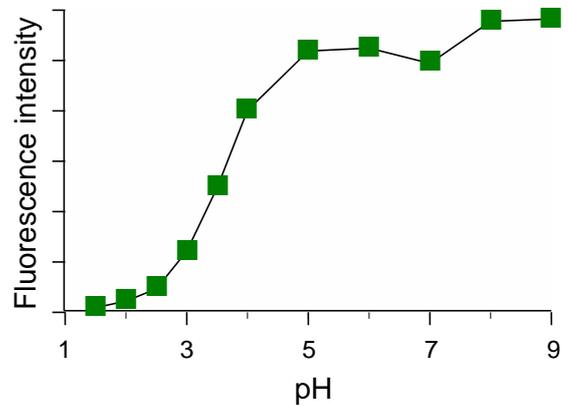


図2 蛍光分子プローブの蛍光強度に対する pH 影響

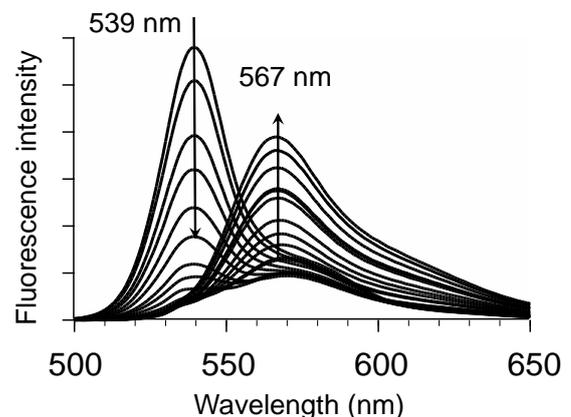


図3 Zn²⁺濃度の増加 (1-50 μM) に伴う色素の蛍光スペクトル変化. λ=535 nm.

0.535 μM (35 $\mu\text{g/L}$) であった。前述の検量線を用いてプローブにより路面排水中の Zn^{2+} 濃度 ($\text{Zn}^{2+}(\text{P})$) を定量した。この結果をICP-AESにて測定した路面排水中の Zn^{2+} 濃度 ($\text{Zn}^{2+}(\text{I})$) と比較した(図5)。茨城で採取された路面排水を除き、 $\text{Zn}^{2+}(\text{I})$ の増大に伴い $\text{Zn}^{2+}(\text{P})$ は増大した。すなわち、新規蛍光分子プローブを用いれば、路面排水をろ過するのみで、他のいかなる前処理も必要とせず、 Zn^{2+} の半定量的測定が可能となる事が明らかとなった。しかしながら、 $\text{Zn}^{2+}(\text{I})$ が $\text{Zn}^{2+}(\text{P})$ よりも低くなる傾向が見られた。これはプローブは路面排水中のフリーの Zn^{2+} のみと配位結合可能であり、有機物や陰イオンに補足されており、その結合定数がプローブのそれよりも大きい場合、プローブがこのような結合状態の亜鉛を認識できなかったためと考えられる。また、 Cu^{2+} と Fe^{2+} による消光作用も理由の一つとして考えられる。

4. 結論

本研究で開発した新規蛍光分子プローブはイオン選択性を検討した結果、 Zn^{2+} に選択的に応答し、蛍光波長および蛍光強度が変化した。プローブはアルカリ金属およびアルカリ土類金属の妨害を受けなかった。しかしながら Cu^{2+} ならびに Fe^{2+} はプローブの蛍光を消光した。2波長の蛍光強度比を Zn^{2+} 濃度に対しプロットすることにより Zn^{2+} 濃度1から50 μM の範囲で検量線を得た。検出限界は8 $\mu\text{g/L}$ 、定量限界は28 $\mu\text{g/L}$ であった。このプローブを用いることで、路面排水をろ過するのみで、路面排水中の Zn^{2+} 濃度を極めて簡便に半定量的に測定できた。今後は、他の重金属イオンを選択的に検出する蛍光分子プローブを開発し、網羅的な重金属イオン分析を目指す。また、蛍光分子プローブを基盤に固定化することにより、繰り返し利用可能なセンサを開発し、環境サンプルのオンサイト・リアルタイムモニタリングを行うことを目指す。

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。

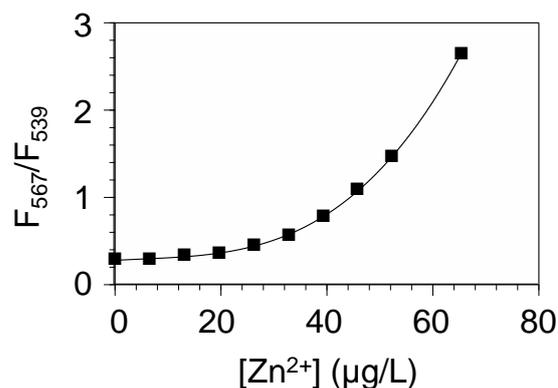


図4 新規蛍光分子プローブの Zn^{2+} に対する検量線
(アセトニトリル/Tris-HCl=1/1、pH7、
 $R = F_{567}/F_{539}$ 、 F = 蛍光強度)

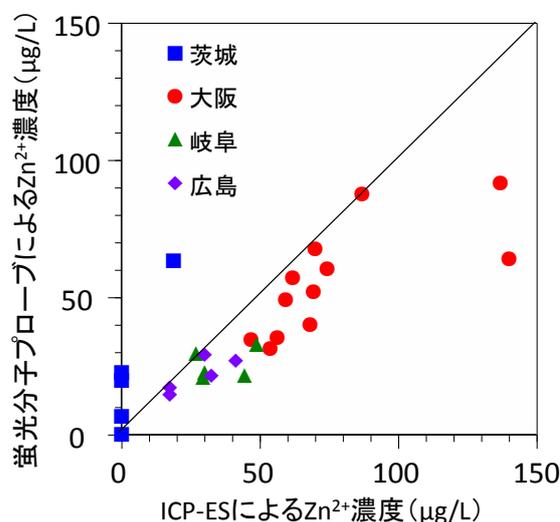


図5 蛍光分子プローブとICP-AESによる Zn^{2+} 濃度測定結果の比較

参考文献

- 1) 環境省 : <http://www.env.go.jp/index.html>
- 2) 厚生労働省 : <http://www.mhlw.go.jp/index.shtml>
- 3) 小島ら, 2012, 水環境学会誌, Vol. 35. No. 8. pp. 119-126
- 4) 伊藤由紀: 欧米における廃棄物処分の現状と地下水・土壌重金属汚染対策技術
- 5) Bernard Valeur. Molecular Fluorescence; Wiley. 2002