

B-54 蛍光色素を用いたレシオメトリー測定による 重金属イオン分析

○羽深 昭¹・谷山 拓生¹・山田 幸司²・高橋 正宏¹・岡部 聡¹・佐藤 久^{1*}

¹北海道大学大学院工学院環境創生工学専攻（〒060-8628 札幌市北区北13条西3丁目）

²北海道大学大学院地球環境科学研究院環境物質科学専攻（〒060-0810 札幌市北区北10条西5丁目）

* E-mail: qsatoh@eng.hokudai.ac.jp

1. はじめに

近年、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。これは、日本国内において、土壌環境基準が定められた平成3年度から平成20年度までの基準超過事例4706件のうち75%以上が重金属による汚染であることから明らかである。このような重金属汚染問題に伴い、環境サンプル(土壌、地下水、河川水、排水等)中の重金属のオンサイト分析のニーズが高まっている。

重金属分析の主流である誘導結合プラズマ(ICP)法および原子吸光法は高感度かつ多種の重金属を一斉分析可能であるが、分析に時間を要する、オンサイト分析ができないという問題点がある。オンサイト分析法として、ポルタンメトリー法などがあるが、夾雑物質の影響が大きいなどの問題点があり、依然として解決すべき課題がある。この問題を解決する分析法として蛍光分光法に着目した。蛍光分光法は高感度かつ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。蛍光分光法を用いた重金属分析には、まず、重金属イオン応答性を示す蛍光色素（フルオロイオノフォア）の開発が必要である。

本研究では蛍光色素母骨格としてボロンジピロメテン（Boron-dipyromethene, Figure 1）を用い、新規フルオロイオノフォアの合成を試みた。ボロンジピロメテン誘導体は、3位の官能基を置換することで吸収および蛍光スペクトルが大きく移動することが知られている¹⁾。しかしながら、3位にイオン配位子を導入した例は少ない。そこで電子密度が大きく変わるイオン配位子を3位に直結することで、蛍光スペクトル変化でイオン濃度を定量できるセンサー分子に利用できると考えた。本研究で開発する新規フルオロイオノフォア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ため、重金属イオン

をレシオメトリー測定により定量することが可能である。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、蛍光退色等の影響がないため、単一波長での測定と比較して定量性が高い²⁾。

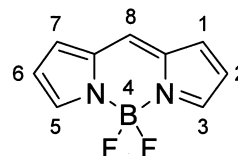


Figure 1 ボロンジピロメテンの構造

2. 実験方法

(1)フルオロイオノフォアの合成

Figure 2に新規フルオロイオノフォア1および2の構造を示す。フルオロイオノフォアの合成は出発化合物より段階的に行った。中間化合物は抽出後、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で精製した。なお、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。

(2)蛍光スペクトル測定

分光蛍光光度計（日本分光, FP-6600）によりフルオロイオノフォアの蛍光スペクトル測定を行った。溶媒はアセトニトリルを用い、金属イオンには過塩素酸塩を用いた。

イオン応答特性を評価するため、フルオロイオノフォア濃度を一定（1 μMまたは4 μM）とし、金属イオンを過剰量（50当量）加え、スペクトル測定を行った。

つづいて、フルオロイオノフォアに応答した金属イオンを用い、蛍光滴定実験を行った。フルオロイオノフォア

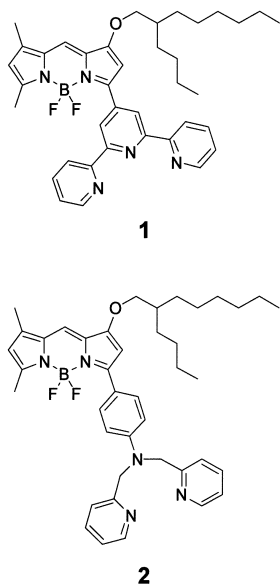


Figure 2 フルオロイオノフオー **1** および **2** の構造
ア濃度一定 ($1\ \mu\text{M}$ または $1.5\ \mu\text{M}$) のもと, 金属イオン濃度を徐々に増加させ, スペクトル測定を行った。

3. 結果および考察

(1) フルオロイオノフオー **1**

Figure 3に金属イオン存在下でのフルオロイオノフオー **1** の蛍光スペクトルを示す。フルオロイオノフオー **1** の蛍光極大波長は $538\ \text{nm}$ であった。金属イオン存在下では蛍光極大波長が長波長側へ移動した。移動幅もイオン種によって異なり, Ca^{2+} ($18\ \text{nm}$), Mg^{2+} ($27\ \text{nm}$), Cd^{2+} ($29\ \text{nm}$), Zn^{2+} ($39\ \text{nm}$) の順に大きくなった。一般にボロンジピロメテンは電子供与基を3位に置換すると分子内電荷移動 (ICT) 機構により蛍光スペクトルが大きく移動する。フルオロイオノフオー **1** は金属イオンに配位することでイオン配位部位の電子供与性が強まり, 極大波長が長波長側へ移動したと考えられる。また, イオン種により極大波長の移動幅が異なったのは, 各イオン種のイオン配位部位への配位結合の強さが異なるためだと考えられる。

次に, 最も蛍光極大波長の移動幅が大きかった Zn^{2+} を用いて, 蛍光滴定実験を行った。フルオロイオノフオー **1** の濃度を一定 ($1.5\ \mu\text{M}$) とし, Zn^{2+} 濃度を1当量 ($1.5\ \mu\text{M}$) まで徐々に増加させた際の蛍光スペクトル変化を Figure 4に示す。 Zn^{2+} 濃度の増加に伴い, フルオロイオノフオー **1** 自身に由来する $538\ \text{nm}$ での蛍光強度が減少し, Zn^{2+} と錯体形成した際の $565\ \text{nm}$ での蛍光強度が増加した。

Figure 4に示した蛍光スペクトル変化から, $538\ \text{nm}$ および $565\ \text{nm}$ での蛍光強度比 (F_{565}/F_{538}) を Zn^{2+} 濃度に対しプロットすることでシグモイド型の検量線を得ることができた (Figure 5)。 Zn^{2+} 検出範囲は $0.01\ \text{mg/L}$ から $0.3\ \text{mg/L}$ で

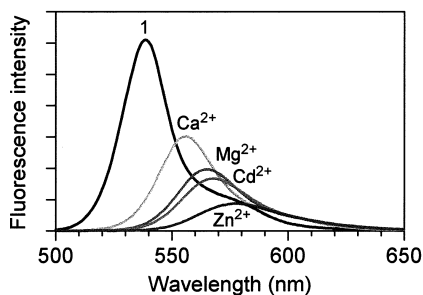


Figure 3 金属イオン存在下での **1** の蛍光スペクトル
(励起波長 $515\ \text{nm}$)

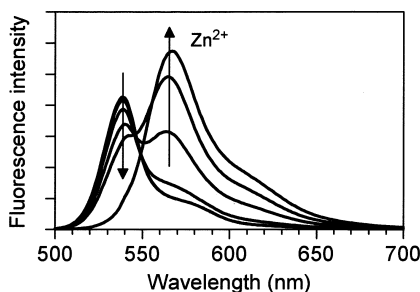


Figure 4 Zn^{2+} 濃度増加に伴う **1** の蛍光スペクトル
(励起波長 $540\ \text{nm}$)

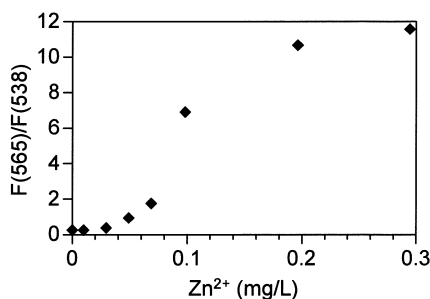


Figure 5 Zn^{2+} 濃度に対する **1** の蛍光強度比増加
あった。

(2) フルオロイオノフオー **2**

Figure 6に金属イオン存在下でのフルオロイオノフオー **2** の蛍光スペクトルを示す。フルオロイオノフオー **2** は $595\ \text{nm}$ に弱い蛍光を示した。重金属イオン存在下では蛍光極大波長が短波長側へ移動した。 Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} をそれぞれ加えると, $544\ \text{nm}$ に蛍光極大を示し, Pb^{2+} はわずかに蛍光強度が低かった。 Hg^{2+} を加えた際の蛍光極大波長は $549\ \text{nm}$ であり, 上記3種の重金属イオンと比較すると $5\ \text{nm}$ 長波長側に蛍光極大を示した。フルオロイオノフオー **2** は金属イオンに配位することで蛍光極大波長が短波長側へ移動した。これはフルオロイオノフオー **1** とは

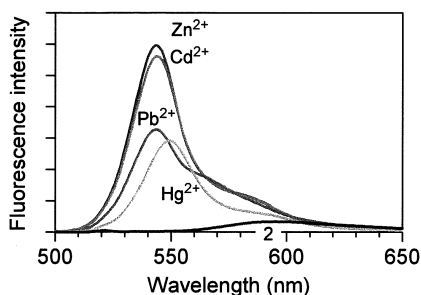


Figure 6 金属イオン存在下での **2** の蛍光スペクトル (励起波長 520 nm)

逆に、イオン配位部位の電子供与性が弱まったためだと考えられる。

次に、フルオロイオノフォア**2**についても応答性の高かった Zn^{2+} を用いて、蛍光滴定実験を行った。フルオロイオノフォア**2**の濃度を一定 ($1\ \mu\text{M}$) とし、 Zn^{2+} 濃度を10当量 ($10\ \mu\text{M}$) まで徐々に増加させた際の蛍光スペクトル変化をFigure 7に示す。 Zn^{2+} 濃度の増加に伴い、 Zn^{2+} と錯体形成した際の544 nmでの蛍光強度が増加した。

フルオロイオノフォア**1**と同様に、Figure 7に示した蛍光スペクトル変化から、595 nmおよび544 nmでの蛍光強度比 (F_{544}/F_{595}) を Zn^{2+} 濃度に対しプロットすることでシグモイド型の検量線を得ることができた (Figure 8)。 Zn^{2+} 検出範囲は0.1 mg/Lから0.7 mg/Lであった。

フルオロイオノフォア**1**と**2**を比較すると、フルオロイ

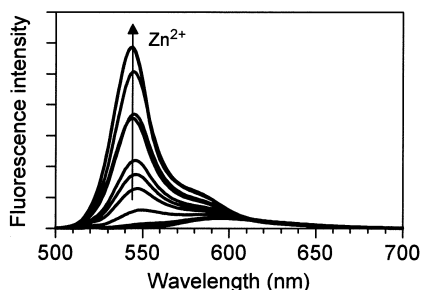


Figure 7 Zn^{2+} 濃度増加に伴う **2** の蛍光スペクトル (励起波長 520 nm)

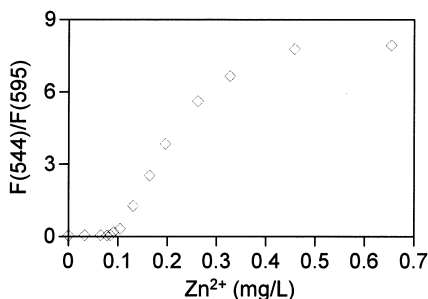


Figure 8 Zn^{2+} 濃度に対する **2** の蛍光強度比増加

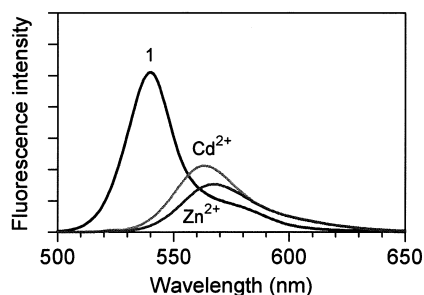


Figure 9 含水アセトニトリル中での **1** の蛍光スペクトル (励起波長 520 nm)

オノフォア**1**は Zn^{2+} に対する結合力が強く、低濃度の Zn^{2+} にも応答するため、検出限界が低くなったと考えられる。一方、フルオロイオノフォア**2**は Zn^{2+} に対する結合力はフルオロイオノフォア**1**と比べると弱い、そのためにフルオロイオノフォア**1**よりも検出濃度が広範囲であったと考えられる。

(3)含水アセトニトリル中でのスペクトル測定

フルオロイオノフォア**1**を用い、水10%を含むアセトニトリル中で蛍光スペクトル測定を行った (Figure 9)。その結果、Figure 3で示したようにアセトニトリル中では Ca^{2+} および Mg^{2+} にも応答したが、含水アセトニトリル中では上記2種類のイオンには応答せず、スペクトルの変化はなかった。これは Ca^{2+} および Mg^{2+} が水和したためだと考えられる。また、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} をそれぞれ加えると蛍光極大波長が長波長側へ移動した。移動幅はそれぞれ24 nmおよび27 nmであり、アセトニトリル中よりも移動幅が狭くなった。

4. 結論

これまでに本研究では重金属イオンに応答する新規フルオロイオノフォアを2種類開発することに成功した。また、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。しかしながら本研究で合成したフルオロイオノフォアは Zn^{2+} 以外の金属イオンにも応答するため、選択性は高くないといえる。一般に、単一のイオンに高選択性を示すフルオロイオノフォアの開発は困難なことから、今後本研究ではイオン選択性の異なるフルオロイオノフォアを複数開発し、スペクトル解析により多種の重金属イオンを同時定量することを試みる予定である。また、センサー装置を開発するためにフルオロイオノフォアの基板上への固定化にも取り組む。

参考文献

- 1) T. Rohand *et al.*, *Chem. Commun.* 2006, 266-268
- 2) Bernard Valeur, *Molecular Fluorescence*, Wiley: 2002