

B-62 新規蛍光色素を用いた重金属イオン分析

○羽深 昭¹・谷山 拓生¹・菅藤 亮輔¹・吉川 弘晃²
山田 幸司³・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北海道大学工学部環境社会工学科（〒060-8628札幌市北区北13条西3丁目）

³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（〒060-8610札幌市北区北10条西5丁目）

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

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3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。

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色素の特性評価（検量線作成、イオン選択性、pH影響）を試みた。

2. 実験方法

(1) 蛍光色素の合成

図1に蛍光色素1および2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。

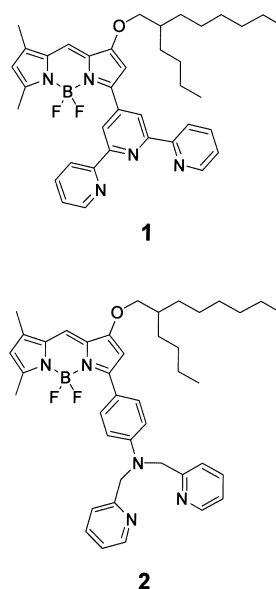


図 1. 蛍光色素 1 および 2 の分子構造

(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。

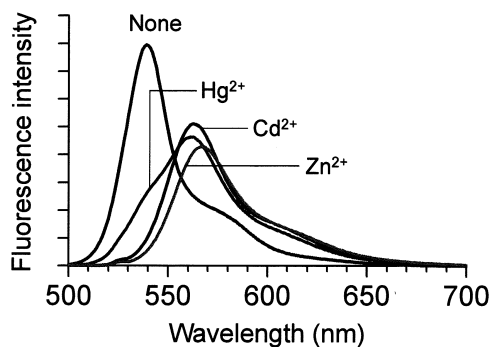


図 2. 重金属イオン (50 μM) による蛍光色素 1 (1 μM) の蛍光スペクトル変化 ($\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$)

3. 結果および考察

(1) 蛍光色素1の金属錯体の蛍光特性

図2に重金属イオン溶液 (50 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539 nmに蛍光極大波長を示した。溶液中に Hg^{2+} , Cd^{2+} または Zn^{2+} を加えると、蛍光スペクトルが長波長側へ移動した。蛍光極大波長 (Hg^{2+} : 562 nm, Cd^{2+} : 563 nm, Zn^{2+} : 567 nm) および強度は若干ではあるがイオン種によって異なった。重金属イオン添加前後では、目視の蛍光色も黄緑色から橙色へと変化した。

続いて、最も長波長側に蛍光が移動した Zn^{2+} を用いて蛍光滴定実験を行った。蛍光色素1の濃度を1 μM に固定し、 Zn^{2+} 濃度を0 μM から50 μM (50当量) まで徐々に増加させた際の蛍光スペクトル変化を図3に示した。 Zn^{2+} 濃度の増加に伴い、蛍光色素由来の波長539 nmの蛍光の強度は徐々に低下した。一方、色素と Zn^{2+} との錯体が発する波長567 nmでの蛍光強度は増強した。つまり、この2波長での蛍光強度 (F) の比 ($R = F_{567}/F_{539}$) は Zn^{2+} 濃度の増加に従って増大する。図4にR値の比を用いて作成した検量線を示した。図4には蛍光色素2の Zn^{2+} の検量線も併せて示した。 Zn^{2+} 定量範囲は色素1では0.01–1.0 mg/L、色素2では0.1–300 mg/Lであった。この結果から、色素1は色素2よりも Zn^{2+} に対する結合力が強く、より低濃度の Zn^{2+} を定量可能であることが明らかとなった。一方、色素2は Zn^{2+} に対する結合力は色素1よりも弱いものの、より広範囲の Zn^{2+} 濃度を定量可能であった。以上より、単一の蛍光色素を用いるよりも複数の蛍光色素を用いることで、定量範囲を拡大できることが示唆された。

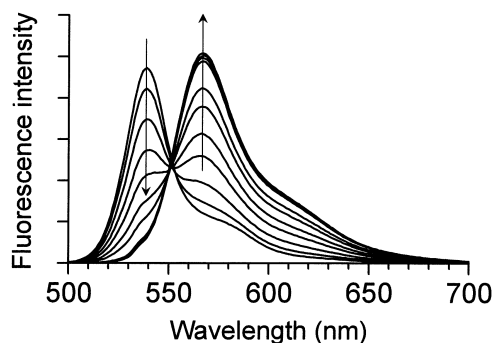


図 3. Zn^{2+} (0–50 μM) による蛍光色素 1 (1 μM) の蛍光スペクトル変化 ($\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$)

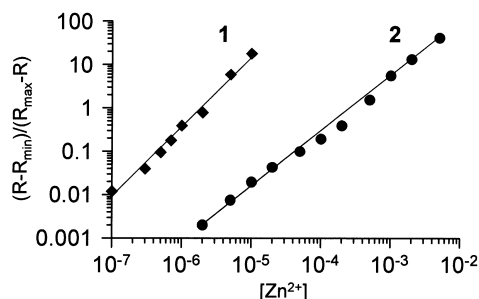


図 4. 蛍光色素 1 および 2 の Zn^{2+} の検量線

(2) 蛍光色素1のイオン選択性

次にイオン選択性を検討した。図5に蛍光色素1 (1 μM) 溶液に Zn^{2+} 以外の金属イオン (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+}) は1 mM, Zn^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} は10 μM) をそれぞれ加えた際のR値を示した。アルカリ金属イオンならびにアルカリ土類金属イオンを色素1と混合した際には蛍光スペクトル (波長および強度) は変化しなかった。 Cd^{2+} を色素1溶液に加えたときにのみR値が増大した。これら各溶液中にさらに Zn^{2+}

を加えるとR値は顕著に増加し、 Zn^{2+} のみを添加した溶液と等しい値 ($R = 8$) となった。この結果から、蛍光色素1が特に Zn^{2+} に対し親和性が高いことが明らかとなった。しかしながら、 Fe^{2+} または Cu^{2+} は蛍光色素1に対し消光作用を示しR値が低下した。つづいて、色素1 (1 μM) の溶液に Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ および Ca^{2+} (Zn^{2+} , Cd^{2+} は1 mg/L, Hg^{2+} は0.05 mg/L, Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} は1 mM) 全てのイオンを添加し蛍光スペクトルを測定し、R値を算出した (図6)。溶液内に Zn^{2+} のみな

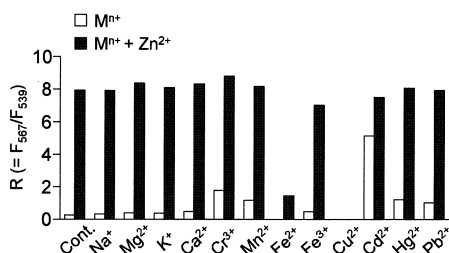


図 5. 各イオン (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} : 1 mM, Zn^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} : 10 μM) および Zn^{2+} (10 μM) 添加後における蛍光色素 1 (1 μM) の R 値

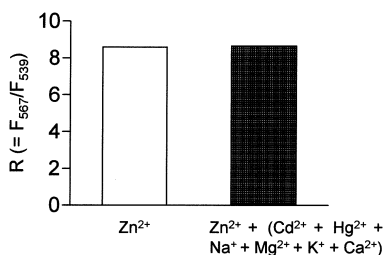


図 6. Zn^{2+} ならびに複数の金属イオン (Zn^{2+} , Cd^{2+} : 1 mg/L, Hg^{2+} : 0.05 mg/L, Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} : 1 mM) を含んだサンプルでの色素 1 (1 μM) の R 値

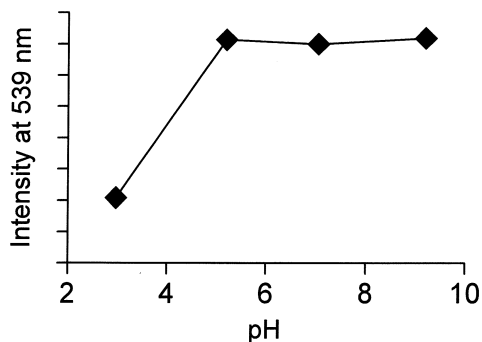


図 7. 色素 1 の蛍光強度に対する pH 影響

らず複数のイオン種が存在しても、R値は Zn^{2+} のみを添加した混合液とほぼ等しくなった。従って色素1はアルカリ金属イオンならびにアルカリ土類金属イオンの妨害はなく、重金属イオンのなかでも Cd^{2+} や Hg^{2+} よりも優先的に Zn^{2+} に応答することが分かった。

(3) 蛍光色素1に対するpH影響

次に蛍光色素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。pH 5, 7および9では蛍光強度は一定であったが、pH 3では蛍光強度が低下した (図7)。これは色素のイオン配位子部位に含まれる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。

4. 結論

蛍光色素1は重金属イオンである Zn^{2+} , Cd^{2+} および Hg^{2+} に反応し、蛍光スペクトルが長波長側へ移動した。最も長波長側に蛍光を発した Zn^{2+} を用いて蛍光滴定実験を行った結果、色素1は Zn^{2+} 濃度の増加に伴い、2波長の蛍光極大波長が増減するシーソー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 Zn^{2+} 検量線を得ることができた。蛍光色素1の Zn^{2+} 定量範囲は0.01 – 1.0 mg/Lであり、色素2よりも低濃度の Zn^{2+} を定量可能であった。一方、色素2は定量限界は高かったものの、より広範囲のイオン濃度を定量可能であることが分かった。色素1は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は受けて、重金属イオンの中でも Zn^{2+} に優先的に応答することが明らかとなった。色素1へのpH影響を調べた結果、pH 3では蛍光強度が低下するものの、pHによる蛍光極大波長の移動はみられなかった。

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