

## N-11 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

○菅藤 亮輔<sup>1</sup>・羽深 昭<sup>1</sup>・吉川 弘晃<sup>1</sup>・大屋 光平<sup>3</sup>  
山田 幸司<sup>2</sup>・高橋 正宏<sup>1</sup>・岡部 聡<sup>1</sup>・佐藤 久<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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)

<sup>2</sup>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)

<sup>3</sup>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、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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。このような背景から、今後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ストリッピングボルタンメトリーが使用されている。しかしながら、ストリッピングボルタンメトリー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<sup>4)</sup>。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、路面排水中に含まれる Zn<sup>2+</sup>を定量したので報告する。

### 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 μM となるように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 加えた (水/アセトニトリル比は 1/9)。重金属イオン溶液は 13 種類の金属イオン (Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup> ならびに Pb<sup>2+</sup>) 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。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。

#### (2) 路面排水中の Zn<sup>2+</sup> 定量

路面排水は雨天時に大阪、茨城、岐阜および広島の間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 μm 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<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>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<sub>CSH</sub>）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<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>ならびにPb<sup>2+</sup>）をそれぞれ加えた。プローブにZn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>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<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、ならびにPb<sup>2+</sup>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、プローブはこれらのイオンの妨害を受けない事が明らかとなった。Cu<sup>2+</sup>とFe<sup>2+</sup>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<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>）を含む溶液に最終濃度が10 μMとなるようにZn<sup>2+</sup>を加え蛍光スペクトルを測定したところ、Zn<sup>2+</sup>のみの溶液に対応する蛍光スペクトル（図1中のZn<sup>2+</sup>）と同様となった。この結果から、プローブがZn<sup>2+</sup>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Zn<sup>2+</sup>濃度の定量

新規蛍光分子プローブを用いてZn<sup>2+</sup>蛍光滴定実験を行った。プローブの濃度を1 μMとし、Zn<sup>2+</sup>濃度を0 μMから50 μM（50当量）まで徐々に増加させた。Zn<sup>2+</sup>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Zn<sup>2+</sup>との錯体に由来する蛍光強度（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（ $R = F_{567}/F_{539}$ ）を

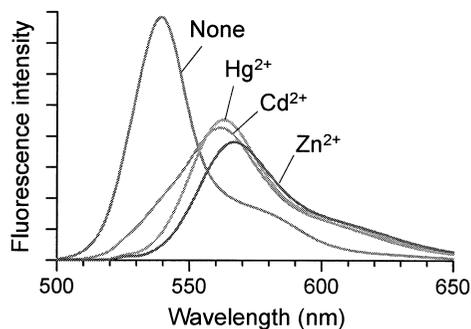


図1 重金属イオン（50 μM）を含む溶液中における新規蛍光分子プローブの蛍光スペクトル。 $\lambda_{ex} = 525$  nm。

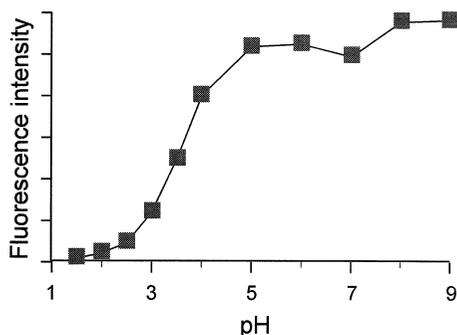


図2 新規蛍光分子プローブの蛍光強度に及ぼす pH の影響。

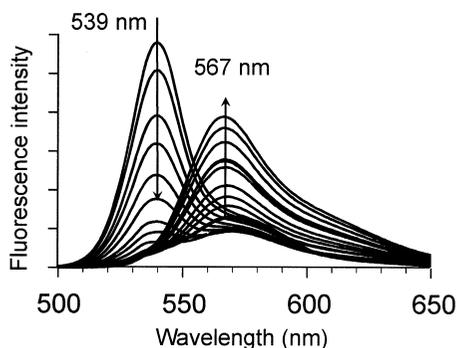


図3 Zn<sup>2+</sup>濃度の増加（1 から 50 μM）に伴う色素の蛍光スペクトル変化（ $\lambda = 535$  nm）

Zn<sup>2+</sup>濃度に対してプロットした結果、Zn<sup>2+</sup>濃度が1から50 μM (65から3270 μg/L) の範囲で検量線を作成できた(図4)。検出限界は0.24 μM (16 μg/L)、定量限界は0.54 μM (35 μg/L)であった。この検量線を用いてプローブにより路面排水中のZn<sup>2+</sup>濃度 (Zn<sup>2+</sup>(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<sup>2+</sup>濃度 (Zn<sup>2+</sup>(I)) と比較した(図5)。茨城で採取された路面排水を除き、Zn<sup>2+</sup>(I)の増大に伴いZn<sup>2+</sup>(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<sup>2+</sup>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、Zn<sup>2+</sup>(I)がZn<sup>2+</sup>(P)よりも低くなる傾向が見られた。これはプローブが路面排水中のフリーのZn<sup>2+</sup>のみと配位結合可能であり、Zn<sup>2+</sup>が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とZn<sup>2+</sup>との結合定数よりも大きい場合、プローブがこのような結合状態のZn<sup>2+</sup>を認識できなかったためと考えられる。また、Cu<sup>2+</sup>とFe<sup>2+</sup>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Zn<sup>2+</sup>に選択性があった。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<sup>2+</sup>ならびにFe<sup>2+</sup>はプローブの蛍光を消光した。2波長の蛍光強度比をZn<sup>2+</sup>濃度に対しプロットすることによりZn<sup>2+</sup>濃度65から3270 μg/L) の範囲で検量線を作成できた。検出限界は16 μg/L、定量限界は35 μg/Lであった。このプローブを指示薬として、路面排水をろ過するのみで、路面排水中のZn<sup>2+</sup>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板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。

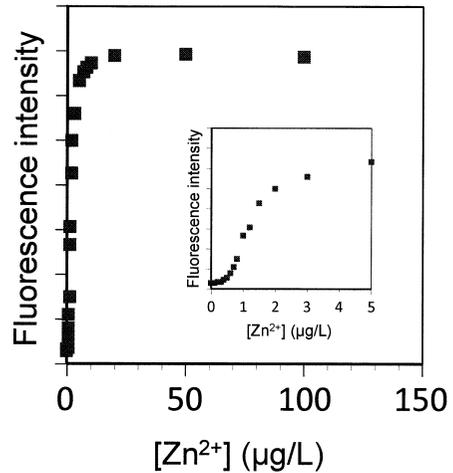


図4 新規蛍光分子プローブのZn<sup>2+</sup>に対する検量線。pH 7。

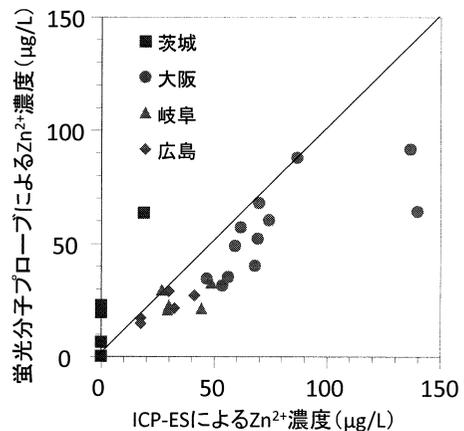


図5 プローブとICP-AESによるZn<sup>2+</sup>濃度測定結果の比較

#### 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) 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) Bernard Valeur. Molecular Fluorescence; Wiley: 2002