

水環境保全と再生水安全性確保のためのマルチ重金属センサの開発

北海道大学大学院工学研究院 佐藤 久

1. はじめに

今日、さまざまな汚染物質から水環境や水資源を保護し保全する重要性が高まっている。代表的な汚染物質として重金属が挙げられる。重金属は人の健康および環境に対して深刻な被害を引き起こすことは良く知られている。特定の金属は少量であれば人間をはじめとする動植物にとって必須元素となるが、大量の摂取はどのような金属であっても急性あるいは慢性毒性を示す可能性がある。自然由来の重金属による土壌・地下水汚染は作物や飲料水を通じて人々の健康リスクを増加させる。

たとえばクロムは世界中で広く使用されている重金属であるが、クロム化合物は遺伝毒性作用を示し肺がんのリスクを高める。クロム排水は主に電気めっき、金属表面処理、革なめし等の工業で発生し、環境中に排出される可能性がある。また、亜鉛も代表的な金属であり、化学製品、金属製品ならびに紙製品などの工業分野において広く使用されている。亜鉛は水生生物や植物にも毒性が疑われている。

現在、重金属の測定は主に原子吸光法と誘導結合プラズマ分光法により行われている。これらの機器分析法は正確ではあるが、機器費用が高く、サンプルの前処理も複雑である。加えて、これらの分析法はオンサイトのモニタリングには使用できない。したがって工業試料や環境試料中の重金属モニタリングに適した低コストかつ簡易な分析法が求められている。

現在までに、吸光光度法やストリッピング・ボルタンメトリーなどの簡易分析法の開発が行われてきた。簡易分析法の中でも蛍光分光法は感度が高く、操作が簡単であり、様々な測定機器への汎用性が高いため、重金属イオンの定量法として望ましい方法である。しかしながら、重金属と特異的に反応して蛍光を発する分子である、フルオロイオノフォアの開発は遅れており、環境分析用のフルオロイオノフォアは皆無である。

新規フルオロイオノフォア的设计と合成は医学および生化学分野では活発な研究分野であり、様々な重金属イオンフルオロイオノフォアが報告されている。重金属イオンと複合体を形成することで単一波長での蛍光強度の増減を示す発光色素や消光色素に比べ、蛍光極大波長がシフトするレシオメトリック蛍光色素がより感度が高い。レシオメトリックフルオロイオノフォアは波長応答を示すため、試料中の分析対象物に関して

より多くの情報を得ることができる。また、分析対象物濃度もより正確に定量することができる。なぜなら 2 波長の蛍光強度比はフルオロイオノフォア濃度、光源強度および機器感度に依存しないからである。そのためレシオメトリックフルオロイオノフォアの開発は依然として魅力的な研究課題となっている。

本研究では重金属イオンのレシオメトリック測定に向け、4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) 蛍光色素を母骨格に用い、BODIPY の 3 位にイオン配位子を置換することで非対称型の BODIPY フルオロイオノフォアの合成を試みた。BODIPY 蛍光色素は多くの優れた性質をもつ。例えば、バンド幅が狭く鋭い吸収および蛍光スペクトルを示し、高い蛍光量子収率とモル吸光係数を持ち、さらに光化学的安定性が高い。さらに BODIPY 蛍光色素は置換基効果の影響を受けやすく、構造を変化させることで吸収および蛍光極大波長がシフトすることが知られている。これまでに数多くの BODIPY フルオロイオノフォアが報告されているが、これらは全てアミノ基をイオン配位子として BODIPY の 3 位に置換したものであり、ピリジン誘導体を BODIPY の 3 位に導入したレシオメトリック型 BODIPY フルオロイオノフォアはこれまでに報告されていない。そこで、本研究ではピリジン誘導体である 2,2':6',2''-terpyridine を BODIPY の 3 位に導入した新規レシオメトリック型 BODIPY フルオロイオノフォア (BDP-TPY) の開発を行った。また、比較対象として従来から多く用いられてきたアミノ基である bis(pyridin-2-ylmethyl) amine をイオン配位子として導入した新規フルオロイオノフォア (BDP-DPA) も合成した。

2. 実験方法

Hafuka et al. (2013) の方法に準拠して BDP-TPY および BDP-DPA を合成した。合成スキームを図 1 に示す。

蛍光および吸収スペクトルは下記の方法で測定した。水溶液の調製には Milli-Q 水 (18.25 MΩ cm) を用いた。フルオロイオノフォアを分光分析用アセトニトリルに溶かし標準液を調製した。また、金属過塩素酸塩を Tris-HCl 緩衝液 (10 mM) に溶かし、金属イオン標準液を調製した。10 mL メスフラスコ中にフルオロイオノフォア標準液、続いて適切な量の金属イオン標準液を加え、アセトニトリルと Tris-HCl 緩衝液 (10 mM) でメスアップし、各種分析試料溶液を調製した。すなわち、これら分析試料溶液の溶媒組成は含水アセトニトリル (CH₃CN/H₂O = 9/1, v/v, Tris-HCl 1 mM) である。

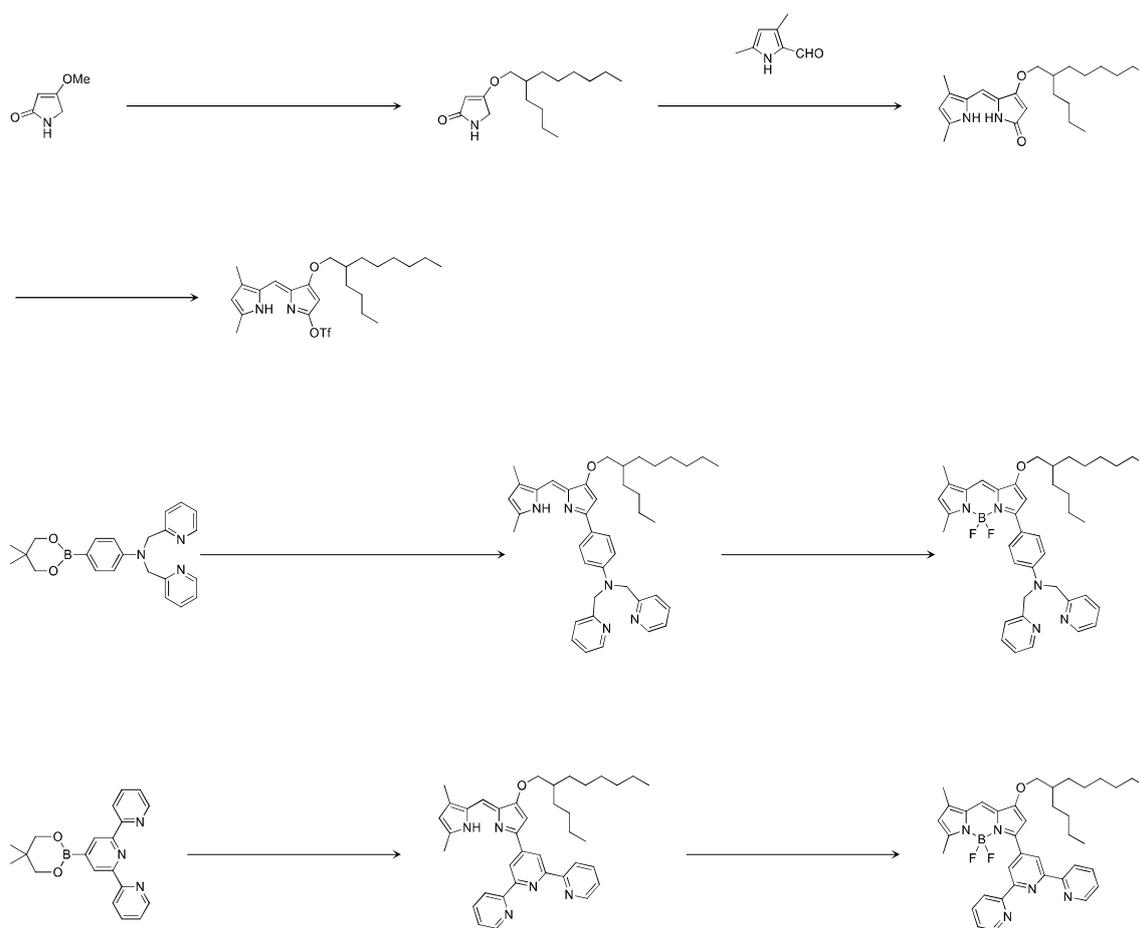


図 1

調製した分析試料溶液を石英セル（横断面 1 cm × 1 cm）に入れ、蛍光分光光度計蛍光（日本分光，JASCO FP-6600）および分光光度計（日本分光，JASCO V-630）を用いて蛍光および吸収スペクトル測定を行った．励起光および蛍光のスリット幅はそれぞれ 5.0 nm および 6.0 nm とした．フルオロイオノフォアのみを含むブランク溶液 11 試料の蛍光および吸収スペクトル測定の結果から得られた標準偏差 (σ) から検出限界 ($3\sigma/\text{slope}$) および定量限界 ($10\sigma/\text{slope}$) を算出した．

ローダミン 6G 水溶液 ($\Phi = 0.76$) を標準物質とし分析試料溶液の蛍光スペクトルと比較することで，以下の式により蛍光量子収率を求めた．

$$\Phi_S = \Phi_R \times S_S/S_R \times A_R/A_S \times (\eta_S/\eta_R)^2$$

Φ : 蛍光量子収率

S : 蛍光スペクトルの面積

A : 励起波長での吸光度

η : 溶媒の屈折率

下付きの S は **Sample**, すなわち分析試料溶液を, R は **Reference**, すなわちローダミン 6G 水溶液を意味している.

3. 結果と考察

BDP-DPA に導入したイオン配位子である Bis(pyridin-2-ylmethyl) amine は分子内電荷移動 (ICT: Intramolecular Charge Transfer) 機構において電子供与性を示す化合物であり, 様々なフルオロイオノフォア的设计に用いられている. 一方, BDP-TPY に導入した 2,2':6',2''-terpyridine は MLCT 遷移を示す複素環式化合物であり, Zn^{2+} などいくつかの金属に対し高い結合定数で配位することが知られている. 本合成スキームでは鈴木・宮浦クロスカップリング反応によりイオン配位子を BODIPY 母骨格の 3 位に直結した. このような合成スキームによりジピロメテントリフラートである化合物 1 を共通原料とし, アミノ基だけでなくピリジル基を置換した BODIPY フルオロイオノフォアの合成が可能であり, 様々な種類のイオン配位子を導入可能である.

BDP-DPA の金属イオン応答を確認するため, 蛍光および吸光滴定実験を行った. 図 2 はそれぞれ異なる単一の金属イオンを加えた時の BDP-DPA の蛍光スペクトル変化を示している. 金属イオンが存在しない系, つまり BDP-DPA 自身の蛍光極大波長は 591 nm であり, ブラックライト照射下において目視で確認すると赤紫色の蛍光色を示した. 蛍光量子収率は 0.13 と比較的低い値であった. Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} および Pb^{2+} をそれぞれ添加すると BDP-DPA の蛍光極大波長はブルーシフトした. 興味深いことに波長シフトのパターンは 3 つのグループに分かれ, 蛍光波長および強度は金属イオン種に依存した. Zn^{2+} および Cd^{2+} が最も大きなブルーシフトを示し, 蛍光極大波長 591 nm からそれぞれ 547 nm, 549 nm へとシフトした. これら 2 つの金属イオンと比較して, Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} および Pb^{2+} は僅かなブルーシフトを示し, 蛍光極大波長は 591 nm から 566 nm へとシフトした. Hg^{2+} は 560 nm 付近にブロードな蛍光を示した.

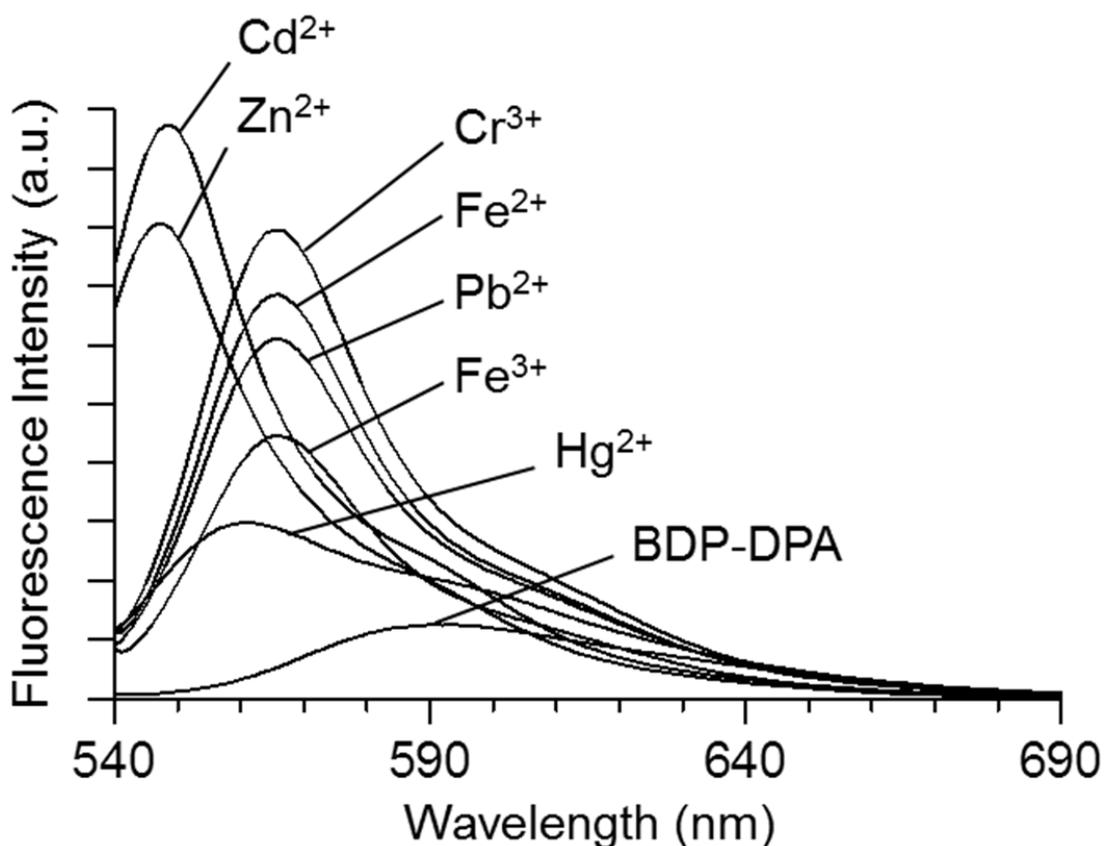


図 2

このような金属イオンによる蛍光波長のブルーシフトはICT機構により説明される。一般的にフルオロイオノフォアの分子構造内に電子供与基（アミノ基など）が含まれ、それがフルオロフォアに結合しているとき、電子供与基からフルオロフォアへと ICT が起こり、結果として蛍光波長のレッドシフトが起こる。つまり、本研究で設計した BDP-DPA ではイオン認識部位かつ電子供与基としてアミノ基である Bis(pyridin-2-ylmethyl) amine を用い、BODIPY フルオロフォアへ直結しているため、ICT が起こり、BODIPY 単独の場合と比較して蛍光波長がレッドシフトし長波長の蛍光が観察される。しかし、イオン配位後にイオンが配位するとアミノ基の電子供与性が低下し、ICT のキャンセルが起こる。その結果としてイオン配位後にはブルーシフトした蛍光が観測される。このとき蛍光量子収率も増加する。このようなスペクトル変化によりレシオメトリック測定によるイオン定量が可能である。また、吸収スペクトルを測定した結果、BDP-DPA は 549 nm に吸収極大を示し、モル吸光係数は $56000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった（表 1）。500 当量の金属イオンを添加すると BDP-DPA の吸収スペクトル

ルはブルーシフトした。特に Cu^{2+} を添加すると吸収極大波長が 517 nm へと大きくブルーシフトした (表 1)。

表 1

Cation	λ_{abs} (nm)	λ_{flu} (nm)
BDP-DPA	549	591
Cr^{3+}	537	566
Mn^{2+}	549	591
Fe^{2+}	535	566
Fe^{3+}	535	566
Cu^{2+}	517	—
Zn^{2+}	520	547
Cd^{2+}	521	549
Hg^{2+}	538	560
Pb^{2+}	538	566

図 3 に Cr^{3+} 濃度変化による BDP-DPA の蛍光スペクトル変化を示した。 Cr^{3+} の添加により BDP-DPA の蛍光極大波長は 591 nm から 566 nm へと 25 nm ブルーシフトし、 Cr^{3+} 濃度の増加により 566 nm の蛍光強度が増加した。このとき蛍光量子収率も 0.13 から 0.48 に増加した。また、646 nm に等蛍光点が観察された。ブラックライト照射下において目視で蛍光色を観察すると、蛍光色が赤紫色から黄色へと変化した。同様の変化が吸収スペクトルでも観察され、 Cr^{3+} の添加により BDP-DPA の吸収極大波長は 549 nm から 537 nm へと 12 nm ブルーシフトし、542 nm に等吸収点が観察された。500 当量以上の Cr^{3+} 濃度でスペクトルに変化が観察されなくなった。蛍光スペクトル変化において 566 nm および 646 nm での蛍光強度比を Cr^{3+} 濃度に対しプロットすることで、レシオメトリック測定による Cr^{3+} 濃度の定量が可能となった。BDP-DPA のみの蛍光スペクトルから算出した蛍光強度比は 1.3 であり、 Cr^{3+} 濃度増加に伴い蛍光強度比は増加した。500 当量の Cr^{3+} を添加すると蛍光強度比は 17.0 にまで増加した。検出限界は 3.2×10^{-6} M, 定量限界は 1.1×10^{-5} M であった。本研究で開発した BDP-DPA はレシオメトリック測定により Cr^{3+} を定量した世界で 2 例目のフルオロイオノフォアである (Zhou et al., 2008)。BDP-DPA と Cr^{3+} との結合化学両論比および結合定数を求める

ため、Benesi-Hildebrand プロットを作成した (結果は非掲載) . その結果, BDP-DPA と Cr^{3+} は 1 対 1 で結合していることが明らかとなった, また, 結合定数は $3.94 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であり, 既報の Cr^{3+} フルオロイオノフォアと比べ高い値であった.

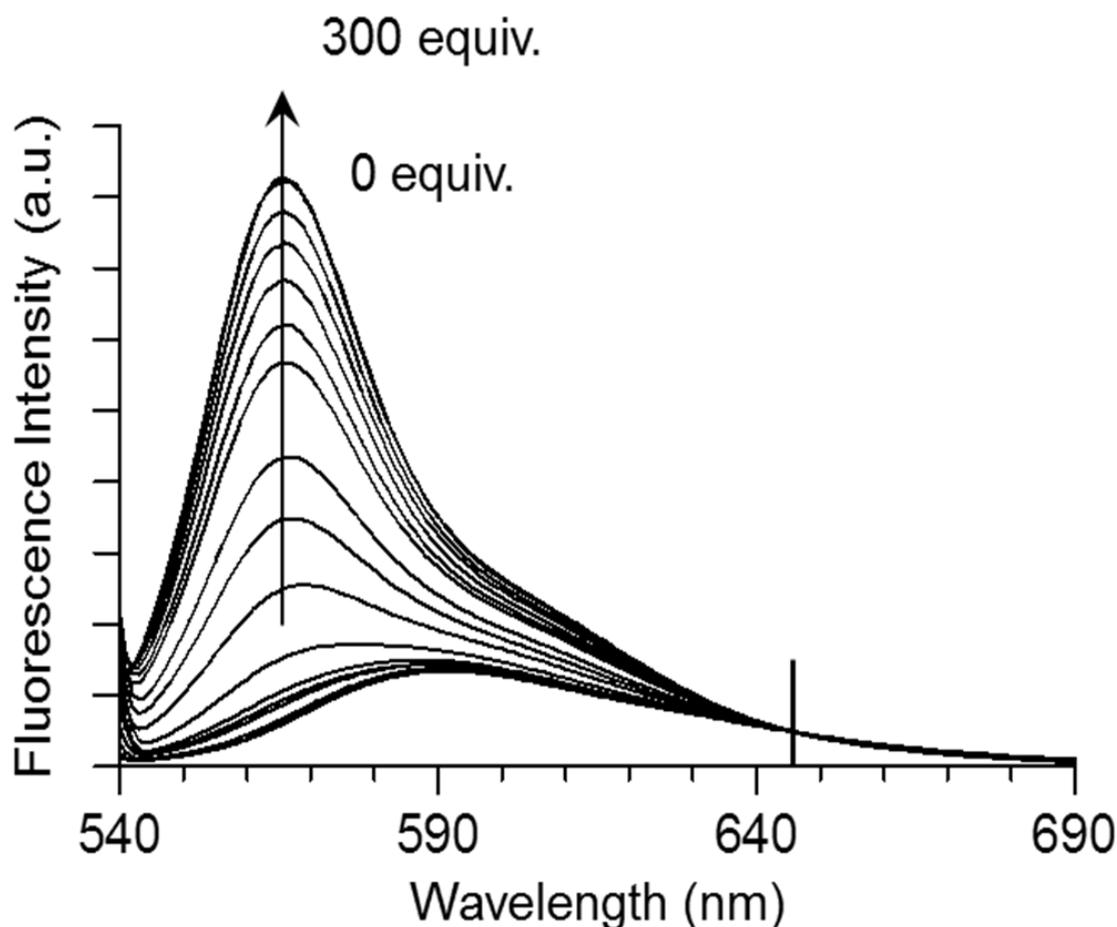


図 3

次に BDP-TPY の金属イオン応答を確認するため, 蛍光および吸光滴定実験を行った. 図 4 はそれぞれ異なる単一の金属イオンを加えた時の BDP-TPY の蛍光スペクトル変化を示している. BDP-TPY の蛍光極大波長は 539 nm であり, 580 nm 付近に BODIPY 特有の肩を持つ蛍光スペクトルを示した. 蛍光量子収率は 0.91 と高い値を示した. ブラックライト照射下において目視で確認すると黄緑色の蛍光色を示した. BDP-DPA とは対照的に Zn^{2+} , Cd^{2+} または Hg^{2+} を添加すると BDP-TPY の蛍光スペクトルはレッドシフトし, 波長シフト幅はイオン種に依存した. BDP-TPY の Cd^{2+} 錯体, Hg^{2+} 錯体はそれぞれ 563 nm, 561 nm に蛍光極大を示した. Zn^{2+} 錯体が最も大きなレッドシフトを示し, 567 nm に蛍光極大を示した. BODIPY フルオロフォアの 8 位に Terpyridine

を置換したフルオロイオノフォアが既に報告されているが、これは Zn^{2+} に対し消光を示すフルオロイオノフォアである。ピリジル型のイオン配位子である Terpyridine を BODIPY の 3 位に置換した非対称型の BODIPY フルオロイオノフォアである BDP-TPY を開発した研究は過去に無く、金属イオンに対しレッドシフトを示す光学物性も本研究で初めて観察されたものである。ピリジル基のような電子吸引性基であるイオン配位子がフルオロフォアの π 電子系に組み込まれている場合、イオン配位により励起状態が基底状態よりもより安定化され、結果として蛍光スペクトルがレッドシフトすることが知られている。BDP-TPY では Terpyridine がイオンと相互作用し、上記のような機構により蛍光スペクトルがレッドシフトしたと考えられる。このような蛍光スペクトルのレッドシフトもレシオメトリック測定によるイオン定量に有効である。

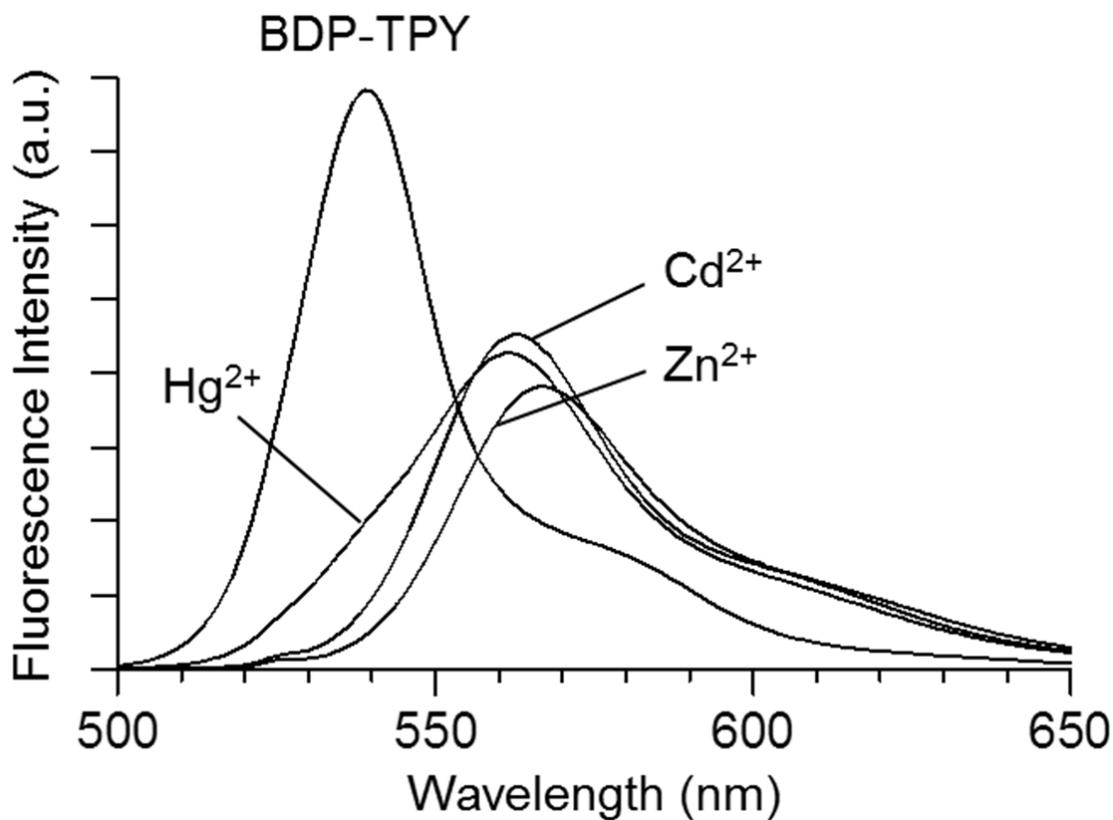


図 4

図 5 に Zn^{2+} 濃度変化による BDP-TPY の蛍光スペクトル変化を示した。 Zn^{2+} の添加により BDP-TPY の蛍光極大波長は 539 nm から 567 nm へと 28 nm レッドシフトし、 Zn^{2+} 濃度の増加により 539 nm の蛍光強度が減少し、 567 nm の蛍光強度が増加した。 また、 551 nm に等蛍光点が観察された。 このとき蛍光量子収率は 0.91 から 0.66 に減少した。 ブラックライト照射下において目視で蛍光色を観察すると、 蛍光色が黄緑色から黄色へと変化した。 10 当量以上の Zn^{2+} 濃度でスペクトルに変化が観察されなくなった。 同様の変化が吸収スペクトルでも観察され、 Zn^{2+} の添加により BDP-TPY の吸収極大波長は 515 nm から 534 nm へと 19 nm レッドシフトし、 525 nm に等吸収点が観察された。 蛍光スペクトル変化において 539 nm および 567 nm での蛍光強度比を Zn^{2+} 濃度に対しプロットすることで、 レシオメトリック測定による Zn^{2+} 濃度の定量が可能となる (図 6) 。 BDP-TPY のみの蛍光スペクトルから算出した蛍光強度比は 0.3 であった。 Zn^{2+} 濃度増加に伴い蛍光強度比は増加し、 10 当量の Zn^{2+} 添加後には蛍光強度比は 8.0 にまで増加した。 検出限界は 5.1×10^{-9} M、 定量限界は 1.7×10^{-8} M であった。 これらの値は環境試料、 化学的および生物学的システム内の Zn^{2+} 濃度を十分に定量できる値である。

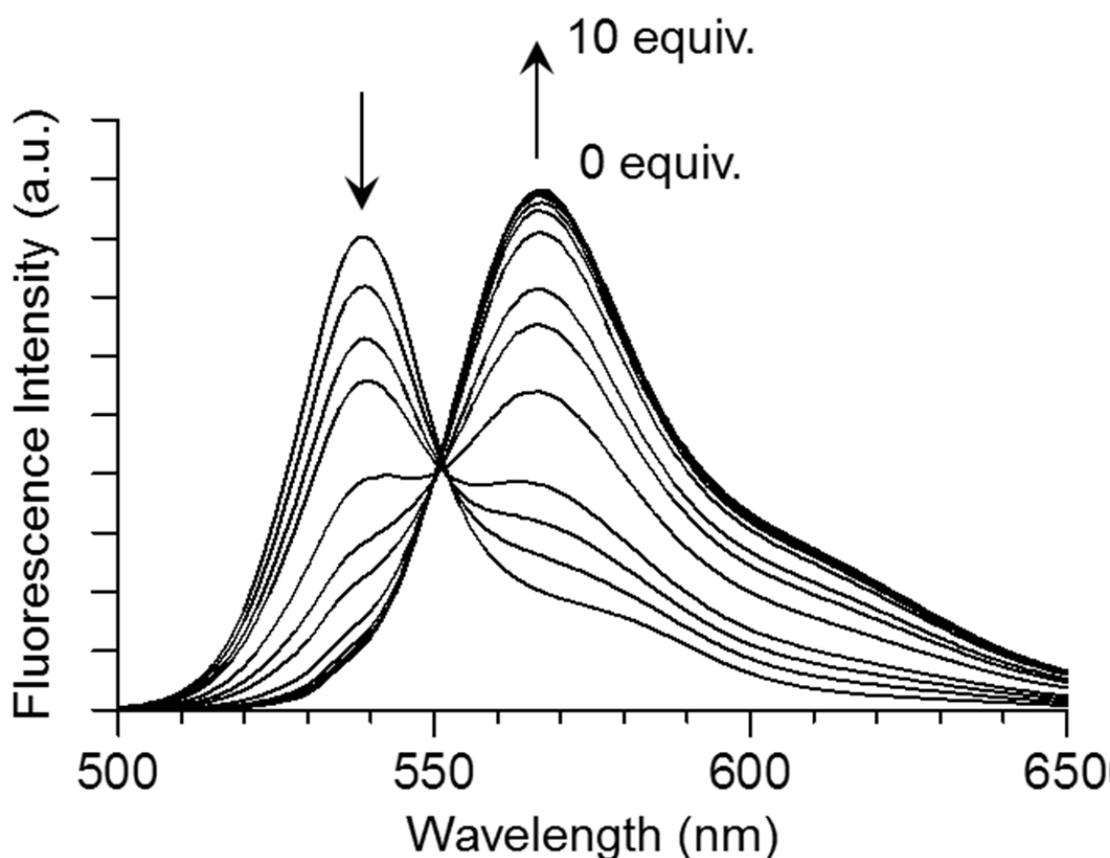


図 5

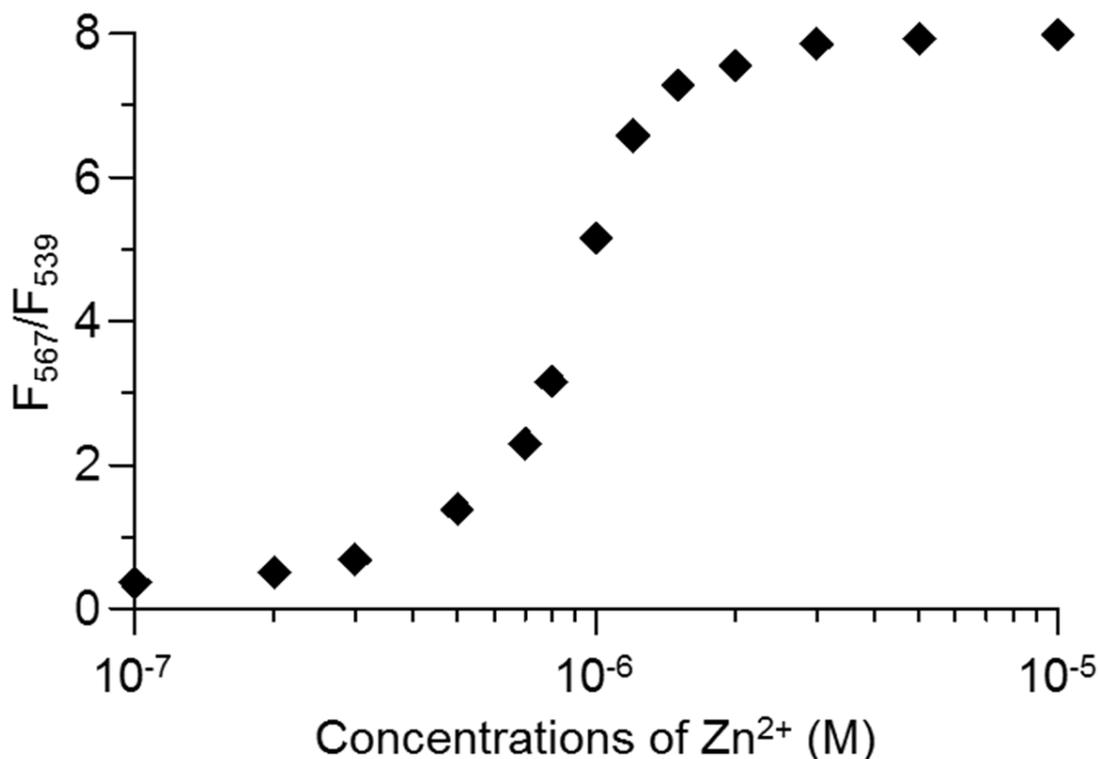


図 6

4. 結論

本章では、鈴木・宮浦クロスカップリング反応により 2 種類の金属イオン配位子をそれぞれ BODIPY の 3 位に直結し、新規フルオロイオノフォア BDP-DPA および BDP-TPY を開発した。重金属イオンを検出すると、BDP-DPA は吸収および蛍光波長がブルーシフトしたのに対し、BDP-TPY はレッドシフトする正反対の波長応答を示した。これまでにピリジン誘導体のイオン配位子を BODIPY の 3 位に置換した非対称型 BODIPY 蛍光色素を開発した研究はなく、ピリジン誘導体である Terpyridine を導入した本研究の BDP-TPY は世界初のピリジン誘導体を有する非対称型 BODIPY 蛍光色素である。それぞれのフルオロイオノフォアはいくつかの金属イオンに応答し、その吸収および蛍光スペクトルはイオン種に依存した。イオン選択性を調べた結果、BDP-TPY と BDP-DPA はそれぞれ Zn²⁺、Cr³⁺に選択性が高いことが明らかとなった。Cr³⁺および Zn²⁺をそれぞれのフルオロイオノフォアの蛍光強度比を利用し、レシオメトリック測定により定量した。以上の結果から BODIPY の 3 位に導入するイオン配位子の種類によってイオン選択性と波長応答を変更できることを明らかにした。また、イオン配位

子のみを変えることで様々な蛍光色素を開発する手法を構築した。イオン配位子のみ変更することで波長応答特性やイオン選択性を変える本アプローチは、将来的な複数種の金属イオン定量を行う際に必要なフルオロイオノフォアの開発に有用である。

謝辞

本研究は、北海道大学地球環境科学研究所環境物質科学専攻 山田幸司准教授、中央大学中央大学理工学部人間総合理工学科 羽深昭助教の協力を得て行われた。本研究は、公益財団法人 JFE21 世紀財団 2013 年度技術研究助成により行われた。記して感謝の意を表す。

参考文献

Akira Hafuka, Hiroki Taniyama, Sang-Hyun Son, Koji Yamada, Masahiro Takahashi, Satoshi Okabe, and Hisashi Satoh (2013) BODIPY-based ratiometric fluoroionophores with bidirectional spectral shifts for the selective recognition of heavy metal ions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 86(1), 37–44.

Zhou, Z., Yu, M., Yang, H., Huang, K., Li, F., Yi, T. and Huang, C., 2008. FRET-based sensor for imaging chromium(III) in living cells. *Chemical Communications* 29, 3387–3389.