

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22350034

 研究課題名（和文） 液液界面上の遷移金属錯体による極微吸光量の顕微分光計測法の開発と
界面機能の評価

 研究課題名（英文） Development of microspectroscopic method measuring faint absorbance
of transition metal complexes existing at liquid/liquid interface
and evaluation of their interfacial functions

研究代表者

塚原 聡 (TSUKAHARA SATOSHI)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50207338

研究成果の概要（和文）：

本研究では、1. 積算顕微画像の超高感度明度解析、2. 直線偏光に吸収特性を示す微小領域の超高感度検出、の2つの手法を主に開発した。これらの手法を用いて、ドデカン-トルエン混合溶媒と水溶液の間の液液界面に吸着したテトラフェニルポルフィナトマンガン(III)の単分子層、および原生動物（単細胞生物）であるミドリゾウリムシとミドリムシ中のクロロフィル a, b が示す極めてわずかな光吸収量を測定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we mainly developed the following two methods, 1. measurements of brightness of small regions of summarized microscope images with a high sensitivity, 2. measurements of brightness of small regions using polarized light with a ultrahigh sensitivity. These methods enabled us to measure faint absorbances and absorption spectra of monolayers of tetraphenylporphyrinatomanganese(III) formed at the dodecane-toluene/water interface and those of chlorophyll a and b in *Paramecium bursaria* and *Euglena*, which belong to protozoa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	10,600,000	3,180,000	13,780,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：液液界面，遷移金属錯体，in situ 顕微分光計測，極微吸収量，配向性

1. 研究開始当初の背景

互いに混じりあわない2種以上の溶媒を用いる溶媒抽出法は、放射性トレーサーのような極微量から工業的規模の多量の物質を扱うことができる代表的な分離法であり、現在でも分析化学を始め、有機化学、化学工業等の多方面で広範に用いられている。その二

相の境界である液液界面は、疎水性物質と親水性物質が拡散して出合う反応場を提供しており、昔から多くの研究者が深い関心を示してきた。

一般に、固液界面や気固界面と比べると、液液界面は空間的に固定することができないため、形態が不安定で、振動したり変形し

たりする。そのため長い間、その分析法には界面張力測定法しか存在しなかった。しかし、近年の分光法の発展によって、液液界面を直接 *in situ* (その場) 測定できる分析法が開発されてきている。特に界面特異的な全内部反射法、第二高調波発生法や和周波発生法などを挙げることができる。申請者らは、薄層二相マイクロセルを世界に先駆けて開発し、液液界面の顕微分光測定に焦点を絞って、種々の測定を行ってきた。その結果、多くの場合、液液界面は濃縮効果があるために不均一であり、それが液液界面の大きな特徴の一つであることが明らかになった。このような不均一性は *in situ* 顕微測定によってのみ発見できたことであり、液液界面の研究に対して一つのブレイクスルーを与えたものと考えている。ところで、液液界面の顕微分光測定を行う場合、対象となる物質の厚さが単分子層レベルであり、しかも 100~1000 倍に拡大するため、極めて高い検出感度を必要とする。そこで、これまでは主に顕微蛍光測定を行ってきた。しかし、蛍光を発する物質は、極めてわずかな物質群であり、非蛍光性の物質の超高感度顕微分析法が強く求められている。なお、液液界面の顕微分光測定を行っているところは、申請者ら以外では、国内外あわせても 1, 2 のグループしかない。

遷移金属錯体は、溶媒抽出の分離のために利用されることは周知の事実であり、これまでに多くの高い光吸収性を示す配位子が開発されてきた。一方、生体中に含まれる微量金属の生体作用が大きな関心を集めている。そのいくつかは、ヘモグロビンやビタミン B12 のように金属イオンとタンパク質や有機化合物が結合していて有色である。また、いわゆる遷移金属イオンの錯体が生理活性を有していることが多く、*d* 電子が生理活性に深く関係している。ところで、液液界面は生体膜のモデルの 1 つとして扱われることがある。また、申請者らは、ごく最近、液液界面に生成したリン脂質単分子膜を、より類似性の高い生体膜のモデルとして提案している。

2. 研究の目的

前述のように溶媒抽出法は、極微量から多量の物質を扱うことができる代表的な分離法であり、現在でも多方面で用いられている。液液界面は、溶媒抽出法の反応場として機能しているが、近年では、液液界面自身の機能が注目され、例えば生体膜のモデルとしても取り扱われる。申請者らは早くから液液界面の *in situ* 顕微分光測定に着手し、世界に先駆けて、液液界面で特徴的に生じる不均一性を明らかにしてきた。本申請研究では、溶媒抽出に用いられたい生理活性を示したりする非蛍光性の遷移金属錯体が液液界面に単分子層レベルで存在する場合、それらが示す

極めてわずかな光吸収量を光源、モノクロメーター、ロックインアンプ、チョッパー等を用いて、極限的に顕微分光計測しようとするものである。これらによって吸光度と吸光スペクトルを算出し、界面濃度や界面における存在状態を取得し、それら界面錯体の機能性について評価する。

3. 研究の方法

本研究は 3 年の期間内に、1. 積算顕微画像の超高感度明度解析、2. 微小領域の明度差の超高感度検出、3. 直線偏光に吸収特性を示す微小領域の超高感度検出、4. 顕微熱レンズ法の適用、の 4 つの要素技術を確立し、液液界面に存在する遷移金属錯体の超高感度顕微分光計測法を開発し、それら遷移金属錯体の界面における機能性を評価する。ここで対象にしている物質は、溶媒抽出-吸光光度法に用いられる配位子を有する遷移金属錯体および生理活性を示す有色の遷移金属錯体である。

これまで申請者らは、透過光を用いた顕微画像について、物質が存在する領域と存在しない領域の明度の比から、吸光度を算出する研究を行ってきた。上記 1~3 は、これをより超高感度化するための方法の提案である。遷移金属錯体を対象に、本申請研究の期間内に、顕微吸光光度法の限界に挑戦したい。特に、吸光度の絶対値測定にこだわり、あらゆる知識や労力、装置を用いて推進する。1. 積算顕微画像の超高感度明度解析は、単色光を透過光の光源として得た顕微画像を複数枚積算して、S/N 比を増大させる手法、2. 微小領域の明度差の超高感度検出は、2 本の光ファイバーを検出部にセットして、相互に変調させて、ロックインアンプで検出する手法、3. 直線偏光に吸収特性を示す微小領域の超高感度検出は、配向性を示す界面錯体について、偏光方向を変調させてロックインアンプで光強度の差を測定する手法、4. 顕微熱レンズ法の適用は、直接吸光度を求めることはできないが、通常吸光度測定よりも 2 桁程度感度が高いと言われている熱レンズ法を用いる方法、である。熱レンズ法の場合は、深さ方向に分布している錯体の濃度変化を求める試みも行う。

4. 研究成果

本研究では、溶媒抽出に用いられたい生理活性を示したりする遷移金属錯体が液液界面に単分子層レベルで存在する場合、それらが示す極めてわずかな光吸収量を、光学顕微鏡、光源、モノクロメーター、超低ノイズ CCD カメラ、アバランシェフォトダイオード、オシロスコープ、ロックインアンプ等を用いて、極限的に顕微分光計測し、極小さな吸光度と吸光スペクトルを取得することを目的とし

ている。その計測によって、遷移金属錯体の界面濃度や界面における存在状態を評価し、機能性について考察するものである。

- (1) ドデカントルエン混合溶媒と水溶液の間の液液界面に吸着したテトラフェニルポルフィナトマンガン(III), $\text{Mn}^{\text{III}}\text{tpp}^+$, に注目し、水溶液の条件を様々に変えて、顕微鏡で液液界面を観察しつつ、*in situ* 顕微分光測定を行った。その結果、酸性、中性、塩基性条件下でそれぞれ形態の異なる3種の集合体が観察された。そこで、それぞれの集合体の吸収スペクトルを測定したところ、それぞれ異なる吸収極大波長を示した。また、偏光を用いて光吸収の異方性を測定したところ、中性条件下で生成した集合体のみ偏光依存性を示した。なお、 $\text{Mn}^{\text{III}}\text{tpp}^+$ の集合体の吸光度と吸光スペクトルを測定するときには、CCDカメラと画像解析用のソフトウェアを用いて顕微画像を複数枚積算し、画像上のシグナルとブランクの明度の比から吸光度を算出する方法を採用した。これによって、顕微鏡下、吸光度約0.03の極微小シグナルの検出を可能にしている。
- (2) 原生動物(単細胞生物)であるミドリゾウリムシとミドリムシに注目し、それらの一つ一つの細胞を実試料として、その細胞内に存在する小器官である共生藻や葉緑体の吸収スペクトルを測ることを目標とした。まず、これらの単細胞生物は、動物細胞であるため、適切な濃度の硫酸ニッケルを加えて、生きたまま運動を止めた。次に、(1)と類似のシステムを用いて、顕微鏡下、単色光を単一細胞に照射し、CCDカメラで顕微画像を15枚積算して取得した。小器官が存在している部分と、存在していない部分の光の強度の比から吸光度を算出した。また、波長を走引することで、吸収スペクトルを取得した。その結果、波長680 nmに強い吸収を示すことがわかった。これは、金属錯体であるクロロフィルに由来するものであり、またその吸収スペクトルから、クロロフィルaとbの濃度や存在比率も求めることができた。さらに、他の波長に吸収を示す色素の存在も確認することが可能であった。
- (3) (1)で検討したドデカントルエン混合溶媒と水溶液の間の液液界面に吸着した $\text{Mn}^{\text{III}}\text{tpp}^+$ に再び注目し、上記のシステムに、さらに $\lambda/2$ 波長板、自動回転ステージ、光弾性変調器(PEM)を組み込んだ新規な*in situ* 顕微分光計測装置の開発を行った。これは、原理的には、液液界面で配向性を示す集合体の極微小な光吸収量を計測できる装置である。種々の光学部品の動作確認や最適化を行った後に、装置の組み立てを行い、実試料である液液界面の $\text{Mn}^{\text{III}}\text{tpp}^+$ の集合体(単分子層)に対して適用した。その結果、

予想通りの性能を示すことが判り、最も小さい吸光度として、0.0006という値を得ることができた。これは、従来の手法よりも50倍以上高感度な分析法である。また、波長を走引することで、吸収スペクトルも有効に測定することが可能であった。さらに、会合体の形と分子の配向性の間に深い関係があることも再確認できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

1. SHINOMORI, Naoki; TSUKAHARA, Satoshi, “Microscope Measurements of Lateral Diffusion of Fluorescent Rhodamine B at Toluene/Water Interface by Total Internal Reflection-Fluorescence Recovery after Photobleaching,” *Chem. Lett.*, **42**, 444-446 (2013). 査読有, DOI: 10.1246/cl.121223.
2. TSUKAHARA, Satoshi; TSURUTA, Tsuyoshi; FUJIWARA, Terufumi, “Surface tension determination through measurements of resonance oscillation of a small surface using dielectric force by a localized alternating current electric field,” *Analyst*, **138**, 2110-2117 (2013). 査読有, DOI: 10.1039/C3AN36260D.
3. MATSUI, Tomoko; TSUKAHARA, Satoshi; WATARAI, Hitoshi, “Single-Molecule Lactonization of Octadecylrhodamine B at a Liquid-Liquid Interface,” *Langmuir*, **28**, 15428-15432 (2012). 査読有, DOI: 10.1021/la302375z.
4. ADACHI, Kenta; TANAKA, Shohei; YAMAZAKI, Suzuko; TAKECHI, Hideaki; TSUKAHARA, Satoshi; WATARAI, Hitoshi, “Chirality induction and amplification in methylene blue H-aggregates via D- and L-phenylalanine pre-adsorbed on the tungsten oxide nanocolloid surface,” *New J. Chem.*, **36**, 2167-2170 (2012). 査読有, DOI: 10.1039/C2NJ40415J.
5. TSUKAHARA, Satoshi; MATSUMOTO, Yuji; URASAKI, Singo; MURAMATSU, Masanori; FUJIWARA, Terufumi, “Charge Simulation Method Calculation of the Inhomogeneous Electric Field near the Dodecane/Water Interface Generated by Two Needle Electrodes,” *Solvent Extr. Res. Dev., Jpn.*, **19**, 29-39 (2012). 査読有, <http://www.solventextraction.gr.jp/serdj/index.html>.
6. TSUKAHARA, Satoshi; SHISHINO, Yuichi; FUJIWARA, Terufumi, “Microscope Measurements for the Transient Formation of W/O Emulsions of Sodium Bis(2-ethylhexyl) Sulfosuccinate in the Dodecane/Water

Interfacial Region,” *Langmuir*, **27**, 7392-7399 (2011). 査読有, DOI: 10.1021/la1045173.

7. TSUKAHARA, Satoshi; MUKAI, Kazuaki; WATANABE, Shota; FUJIWARA, Terufumi, “In Situ Fluorescence Microscopic Measurements of the Phase Transition Behavior of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Monolayers Prepared at Hydrocarbon/Water Interfaces,” *Solvent Extr. Res. Dev., Jpn.*, **18**, 149-158 (2011). 査読有, <http://www.solventextraction.gr.jp/serdj/index.html>.
8. Tamer H. A. HASANIN, Yusuke TSUNEMINE, Satoshi TSUKAHARA, Yasuaki OKAMOTO, Terufumi FUJIWARA, “Chemiluminescence from an Oxidation Reaction of Rhodamine B with Cerium(IV) in a Reversed Micellar Medium of Cetyltrimethylammonium Chloride in 1-Hexanol-Cyclohexane/Water,” *Anal. Sci.*, **27**, 297-304 (2011). 査読有, DOI: 10.2116/analsci.27.297.
9. Tamer H. A. HASANIN, Satoshi TSUKAHARA, Terufumi FUJIWARA, “Acid-Base Behavior of Rhodamine B in a Reversed Micellar Medium of Cetyltrimethylammonium Chloride in 1-Hexanol-Cyclohexane/Water,” *Anal. Sci.*, **26**, 1247-1254 (2010). 査読有, DOI: 10.2116/analsci.26.1247.

[学会発表] (計 13 件)

1. 篠森直樹, 塚原 聡, “全内部反射—光退色後蛍光回復法による液液界面上のローダミン B の側方拡散係数の顕微測定”, 日本化学会第 93 春季年会, 立命館大学(草津市), 2013 年 3 月 22 日~25 日.
2. 片山 和也, 塚原 聡, “水性二相界面での酵素による単一 DNA 分子の分解反応の in situ 顕微蛍光測定”, 第 31 回溶媒抽出討論会, 石川県文教会館(金沢市), 2012 年 11 月 16 日~17 日.
3. 豊川裕也, 塚原 聡, 岡本泰明, 藤原照文, “Aerosol OT/水/イソオクタン系におけるトリプシンの溶媒抽出と構造変化”, 第 31 回溶媒抽出討論会, 石川県文教会館(金沢市), 2012 年 11 月 16 日~17 日.
4. 田中真実, 塚原 聡, “水溶液中における単一金ナノ粒子の動的挙動の顕微測定”, 日本分析化学会第 61 年会, 金沢大学(金沢市), 2012 年 9 月 19 日~21 日.
5. 橋本佑介, 塚原 聡, 岡本泰明, 石坂 昌司, 藤原照文, “液液界面へのレーザー光照射による金ナノ粒子の生成挙動の in situ 顕微測定とその解析”, 日本分析化学会第 61 年会, 金沢大学(金沢市), 2012 年 9 月 19 日~21 日.
6. 塚原 聡, “液液界面現象の in situ 顕微分光計測”, 分析技術研究会 2011 年度研究発表

会, パナソニックリゾート大阪(吹田市), 2012 年 3 月 8 日.

7. 塚原 聡, “In Situ Microscope Measurements of Dynamic Behaviors of Substances Existing at and near Liquid/Liquid Interfaces”, 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム, 波止場会館(横浜市), 2011 年 12 月 19 日~21 日.
8. 塚原 聡, “液液界面における特異反応のリアルタイム顕微計測”, 日本分析化学会近畿支部第二回講演会, 大阪科学技術センター(大阪市), 2011 年 12 月 9 日.
9. 豊川裕也, 塚原 聡, 岡本泰明, 藤原照文, “Aerosol OT/水/イソオクタン系における水溶性色素の抽出と水相の塩濃度の関係”, 第 30 回溶媒抽出討論会, フェニックスシーガイアリゾート(宮崎市), 2011 年 11 月 25 日~26 日.
10. 塚原 聡, “液液界面現象の in situ 顕微分光計測の現状と夢”, 第 30 回溶媒抽出討論会, フェニックスシーガイアリゾート(宮崎市), 2011 年 11 月 25 日~26 日.
11. 八坂栄次, 塚原 聡, 岡本泰明, 藤原照文, “液液界面に形成したテトラフェニルボルフィナトマンガン(III)の会合体の in situ 顕微分光測定と解析”, 日本分析化学会中国四国支部 平成 22 年度広島地区分析技術講演会, 広島大学学士会館レセプションホール(東広島市), 2011 年 3 月 8 日.
12. 塚原 聡, “液液界面における特異反応の in situ 高時空間分解計測への挑戦”, 日本分析化学会中国四国支部 周南地区講演会, 徳曹会館(周南市), 2010 年 12 月 3 日.
13. 八坂栄次, 塚原 聡, 岡本泰明, 藤原照文, “液液界面に吸着したマンガン(III)ポルフィリン錯体の会合体の in situ 顕微分光測定と解析”, 日本分析化学会第 59 年会, 東北大学川内北キャンパス(仙台市), 2010 年 9 月 15 日~17 日.

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院理学研究科化学専攻 分析化学研究室

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/tsukahara/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原 聡 (TSUKAHARA SATOSHI)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：50207338

(2) 研究分担者

藤原 照文 (FUJIWARA TERUFUMI)
広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：80127703

岡本 泰明 (OKAMOTO YASUAKI)

広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：40213988