

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32641

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26889054

研究課題名(和文)水環境中ヒ素の簡易定量に向けた新規蛍光プローブの開発

研究課題名(英文)Development of fluorescent probe for simple quantification of arsenic in water environment

研究代表者

羽深 昭 (Hafuka, Akira)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：30735353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では水環境中ヒ素の簡易定量に向け、新規ヒ素特異的蛍光プローブの開発と性能評価を目的とし研究を行った。プローブの合成に取り組んだ結果、ボロンジピロメテン母骨格ジクロロ体の合成と、金属リガンドの導入に成功した。しかしながら、続く最終段階での目的物であるプローブの合成には至らなかった。研究の過程において、優れたプローブ母骨格を探索するために水環境中の溶存腐植物質との相互作用を調べた。その結果、特定のプローブ母骨格と溶存フミン酸とが特異的に相互作用することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study were to develop fluorescent probe for arsenic and to evaluate its properties. Boron-dipyrrromethene dichloride was successfully synthesized as probe core and metal ligand was introduced to the core. However, final product has not been obtained in the last step. Interactions between probe core and dissolved humic substances were investigated to find superior probe core for future applications. As a result, specific probe strongly interacted with dissolved humic acid.

研究分野：環境工学

キーワード：蛍光プローブ ヒ素 簡易分析 溶存腐植物質 水環境

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ヒ素(As)は生体に対して急性および慢性毒性を示し、発ガン性も有する環境汚染物質の一つである。世界保健機関(WHO)も地表水や地下水のヒ素汚染を深刻な問題として提起している。例えば、ヒ素汚染の深刻なバングラディッシュでは国内での基準値(0.05 mg-As/L)を超過した飲料水摂取により、人口12,500万人のうち3,300~7,700万人が健康リスクに曝されている。

(2)現在、ヒ素の分析法として用いられている手法は、主に誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-OES)および誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)である。これらの機器分析法は選択性および感度が高いが、分析に時間を要する、機器および運転費用が高価である、前処理が煩雑である、といったことからラボ分析のみに用いられる。すなわち、オンサイトでスクリーニング等には使用できない。したがって、ヒ素の簡易分析法の開発が必要である。

(3)簡易分析法の中でも蛍光分光法はSN比および感度が高く、優れた分析手法である。蛍光分光法に必要な蛍光プローブは生化学分野でのイメージングをはじめ、環境工学分野では溶存酸素センサー等にも用いられている。これまでにイオンを特異的に検出・定量する蛍光プローブが数多く開発されてきた。しかしながら、ヒ素に関してはこれまでに蛍光プローブが報告されていない。しかしながら近年、ヒ酸( $\text{AsO}_4^{3-}$ )を特異的に認識する候補化合物が報告されており、この候補化合物を利用して蛍光分子と組み合わせることで、新規ヒ素特異的蛍光プローブを開発できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、水環境中ヒ素の簡易定量に向け、新規ヒ素特異的蛍光プローブを開発することである。具体的には、ヒ素特異的蛍光プローブの合成スキーム構築に取り組む。報告されたヒ素認識部位候補化合物を蛍光プローブに導入する合成ルートを設計し、実施する。本合成ルートでは、はじめに蛍光を発するプローブ母骨格を形成し、その後に母骨格にヒ素認識部位導入することを試みた。目的物質を得る反応条件を明らかにするため、合成の各ステップにおいて反応条件(反応時間、温度、溶媒、試薬量など)を検討する。つづいて、開発した新規蛍光プローブの性能評価を行う。プローブの光物理特性(吸光度、蛍光強度、吸収・蛍光波長、吸光係数、量子収率)を測定し、プローブが実際にヒ酸( $\text{AsO}_4^{3-}$ )を特異的に認識して光物理特性を変化させるか確認する。さらに、ヒ酸選択性、検出・定量下限値、pH依存性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)新規ヒ素特異的蛍光プローブを開発するため、合成ルートを設計した。設計した合成ルートに従い、実際に有機合成実験を行った。本合成ルートでは、はじめに蛍光を発するプローブ母骨格(蛍光分子)を形成し、その後に蛍光分子にヒ素認識部位を導入することとした。ヒ素認識部位は既報の候補化合物をもとに設計し、蛍光プローブ母骨格としてポロンジピロメテン蛍光分子を用いた。新規蛍光プローブを得るため、反応時間、温度、溶媒、試薬量などの反応条件を検討した。プローブの合成は多段階反応であるため、各ステップの反応条件を検討し、目的物質を順に得た。核磁気共鳴装置を利用して $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルを測定した。また、質量分析装置を使用しMSスペクトルを測定した。得られた3種類のスペクトルから、目的物質ができていないかを同定し、確認した。このようにして、段階ごとに合成実験を進め、最終目的物質として新規蛍光プローブを得ることを試みた。

(2)開発した蛍光プローブの光物理特性(吸光度、蛍光強度、吸収・蛍光波長、吸光係数、量子収率など)を明らかにするため、吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した。環境試料にプローブを適用する際には試料中の溶存有機物(Dissolved Organic Matter: DOM)の阻害が懸念されるため、蛍光プローブ母骨格を用いて蛍光消光実験を行った。DOMとして腐植物質を用い、スワニー川フミン酸(IHSS標準試料、2S101H)およびフルボ酸(IHSS標準試料、2S101F)を使用した。蛍光分子溶液と腐植物質溶液とを混合し、試料の吸収および蛍光スペクトルを測定した。得られた蛍光スペクトルからStern-Volmerプロットを作成し、蛍光分子と腐植物質との結合係数を求めた。

## 4. 研究成果

(1)ヒ素特異的蛍光プローブの合成ルートを設計し、合成実験に取り組んだ。反応時間、温度、溶媒、試薬量などの反応条件を検討し、4ステップでポロンジピロメテン母骨格のジクロロ体の合成に成功した。ポロンジピロメテンは、高いモル吸光係数、高い蛍光量子収率、バンド幅の狭く鋭いスペクトル、高い光化学安定性、500nm以上の可視光域に吸収および蛍光極大を示す、などの優れた光物性をもつことが知られている。つづいて、鈴木宮浦クロスカップリング反応を用い、金属リガンドをポロンジピロメテン母骨格に導入した。最後に、蛍光分子-金属リガンドに金属イオンを導入することで、ヒ素特異的蛍光プローブの合成を試みたが、最終目的物質を得ることができなかった。ヒ素特異的蛍光プローブの合成は現在も研究中である。

(2)これまでに用いてきたボロンジピロメテン以外に新規蛍光プローブ母骨格として優れた母骨格を探索するため、蛍光分子と水環境中の DOM との相互作用を調べる実験を行った。蛍光分子としてフルオレセイン、ローダミン 6G およびローダミン B を試験に供した。フルオレセイン、ローダミン 6G の蛍光極大波長はそれぞれ 512 nm、551 nm であった。DOM として用いた腐植物質（フミン酸またはフルボ酸）由来の DOC 濃度が増加すると、上記波長の蛍光強度は減少した（図 1）。これは蛍光分子と腐植物質とが相互作用し、無蛍光性の複合体を形成するためだと考えられる。特にフミン酸によるローダミン 6G の消光は強く、DOC 濃度 5 mg-C/L のフミン酸が存在すると、ローダミン 6G の蛍光量子収率は 0.86 から 0.10 へと大きく低下した。図 2 に腐植物質存在下でのフルオレセインおよびローダミン 6G の Stern-Volmer プロットを示す。腐植物質とフルオレセイン、フルボ酸とローダミン 6G には直線的な関係が見られた。これら直線の傾きから得られる結合係数  $K_{doc}$  の値を表 1 に示す。一方、ローダミン 6G とフミン酸との関係は非直線関係が見られた。この曲線からフロイントリッヒ係数 ( $K_F$ ) を算出した。つづいて、ローダミン 6G と似た化学構造を有するローダミン B を用いて上記と同様の実験を行ったところ、大きな蛍光消光は見られなかった。以上の結果から、ローダミン 6G の蛍光がフミン酸により大きく消光

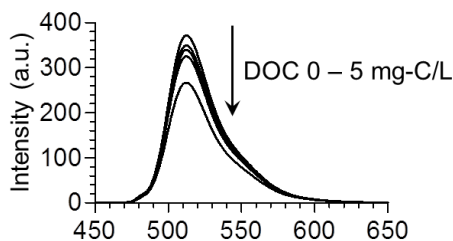


図 1. フミン酸の DOC 濃度増加に伴うフルオレセインの蛍光消光

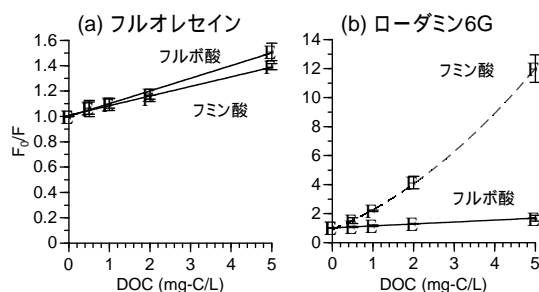


図 2. 腐植物質存在下での (a) フルオレセインおよび (b) ローダミン 6G の Stern-Volmer プロット

表 1. 結合係数 ( $K_{doc}$ ) およびフロイントリッヒ係数 ( $K_F$ )

蛍光分子	腐植物質	$K_{doc}$	$K_F$
フルオレ	フミン酸	$7.57 \times 10^{-2}$	-
セイン	フルボ酸	$1.00 \times 10^{-1}$	-
ローダミ	フミン酸	-	$7.84 \times 10^{-1}$
ン 6G	フルボ酸	$1.34 \times 10^{-1}$	-

したのは、ローダミン 6G が有するカチオン性部位とフミン酸のアニオン部位とが静電相互作用し、この結合が水中での疎水性斥力によって強固になったためだと推察した。本研究で実験に使用したフルオレセインおよびローダミン 6G はトレーサー物質としても使用されており、本研究で得られた溶存腐植物質との相互作用に関する知見は有用であると言える。なお、本研究の研究成果は Water Research 誌に掲載された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

A. Hafuka, Q. Ding, H. Yamamura, K. Yamada, and H. Satoh, "Interactions of dissolved humic substances with oppositely charged fluorescent dyes for tracer techniques", Water Research, 85, pp193-198, 2015. (査読有り)  
doi:10.1016/j.watres.2015.08.039

〔学会発表〕(計 4 件)

羽深昭, 山村寛, 山田幸司, 佐藤久, "蛍光色素と溶存有機物との相互作用に関する研究", 第 49 回日本水環境学会年会, 講演集 p400 金沢大学 (金沢) 2015 年 3 月 (口頭発表)

A. Hafuka, H. Yamamura, K. Yamada, and H. Satoh, "Development of fluorescent indicator for simple quantification of heavy metals", IWA 7th International Young Water Professionals Conference, 発表番号 2814627 台北 (台湾) 2014 年 12 月 (口頭発表 査読無し)

羽深昭, 大屋光平, 瀧谷明義, 山田幸司, 岡部聡, 佐藤久, "銅イオン ( ) に対し高い発光効率を示す 3, 5 位置換 BODIPY 蛍光指示薬", 第 51 回環境工学研究フォーラム, 講演集 pp77-79 山梨大学 (甲府) 2014 年 12 月 (口頭発表)

羽深昭, 山田幸司, 佐藤久, "重金属分析用蛍光色素の開発と環境試料への適用", 第 17 回日本水環境学会シンポジウ

△, 講演集 pp355-360 滋賀県立大学(彦根) 2014年9月(口頭発表)

〔その他〕

ホームページ等

<http://yamamura.waterblue.ws//index.htm>

!

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽深 昭 (HAFUKA, Akira)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号: 30735353