

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：52101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00576

研究課題名(和文) 緊急時に備えた迅速、かつ簡便な放射性ストロンチウム検出法

研究課題名(英文) Rapid and simple detection method for radioactive strontium in case of emergency

研究代表者

千葉 薫 (CHIBA, Kaori)

茨城工業高等専門学校・国際創造工学科・准教授

研究者番号：50415775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：核磁気共鳴法(NMR)と液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い、飛行時間型マトリックス支援レーザーイオン化質量分析装置(MALDI-TOF-MS)のマトリックスとなるジピコリン酸と、Sr²⁺および⁹⁰Srが崩壊して生成されるY³⁺やZr⁴⁺との複合体の分析を行った。その結果、Sr²⁺とジピコリン酸は1:1の複合体を形成するのに対し、YやZrでは、分子量の大きな多量体を形成することがわかった。本研究の結果より、ジピコリン酸とコンパクトな複合体を形成しやすいという性質が、ジピコリン酸を用いたMALDI-TOF-MSを行った場合にSrが1価のイオンとして観測されやすい要因であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法は、東日本大震災に伴う福島第一原子力発電所における原子力災害をきっかけに、非常時、線放出核種である放射性Srを、迅速、簡便に検出する手法として開発された。日本が世界に先駆けて開発したMALDI-TOF-MSに、食品に含まれる安全なジピコリン酸をマトリックスとして用いることで、ジピコリン酸とコンパクトな複合体を形成するSrイオンが効率よく検出される。一方、ベータ崩壊の産物であるYやZrは、ジピコリン酸を多量体化させるため検出されない。特殊な質量分析装置や高度な測定技術、煩雑で時間を要する試料調製が不要の本手法は、万が一の原子力災害への最も適切な備えとなるであろう。

研究成果の概要(英文)：Complexes of dipicolinic acid that is used as a new matrix of the time-of-flight matrix-assisted laser ionization mass spectrometer (MALDI-TOF-MS) with Sr²⁺, or with other ions produced from ⁹⁰Sr by beta-decaying, such as Y and Zr, were analyzed using nuclear magnetic resonance (NMR) and liquid chromatography (HPLC). As a result, it was found that strontium and dipicolinic acid form a 1:1 complex, whereas Y and Zr produced by β -decay of ⁹⁰Sr form high molecular weight multimers. From the results of this study, it was shown for strontium that the higher tendency to form a 1:1 complex with the matrix molecule, dipicolinic acid, facilitates the vaporization of strontium in the MALDI-TOF-MS experiment. This was suggested to be an important factor leading to the result that monovalent strontium ion was selectively observed by the dipicolinic MALDI-TOF-MS experiment.

研究分野：環境化学

キーワード：ストロンチウム ジピコリン酸 MALDI-TOF-MS 質量分析 NMR HPLC

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災における福島第一原子力発電所の事故以降、放射性物質による被曝への関心は全国的に大きく高まった。食品の放射能汚染問題に関する不安は国内のみにとどまらず、国産の食料品の輸出量にも直結する重要事項となった。γ線放出核種である放射性セシウムの分析は簡便に実施できるため、高い需要に応じて多くの検査機関が参入できた。一方、放射性ストロンチウム(Sr)についてはその危険性が指摘されながら、事故後5年近くを経過した当時でも、(財)日本分析センターのみでしか信頼できる依頼分析を行うことができない状況が続いていた。チェルノブイリ事故の際、大気中に放出されたSrが北海道の牛馬の骨に蓄積されたことが明らかになっているが、福島原発では事故直後、大気中への放射性物質の拡散に加え、海に流された多量の冷却水中にも多くの放射性Srが放出され、魚介類中への蓄積(生物濃縮)が懸念され続けてきた。国内で原発の再稼働が始まりつつある今日、骨に蓄積されやすいSrを、迅速に定量分析できる手法の開発は、今後の“万が一”の事態に備え、国民の食の安全を確保しつつ、CO₂を排出しないエネルギーと共存できる未来の安全のための急務であった。

2. 研究の目的

海産物業者からの要請に対して、放射性Srの定量に関して、依頼分析を個々に請け負う検査会社が、震災後5年近くを経過した当時でもほぼ皆無であったのは、従来法の放射性Sr分析に約1ヶ月を要することが原因であり、これが本研究開始の大きな要因であった。従来用いられてきた放射性Sr定量のための公定法(文部科学省放射能測定法シリーズ2、放射性ストロンチウム分析法、財団法人日本分析センター)では、線源となる核種の同定ができないβ線計測が用いられている。そのため、試料調製の段階で実験者の高いスキルと長時間を必要とするストロンチウムの単離操作が必要不可欠で、さらに単離されたSr中に含まれる半減期の異なるSr-89とSr-90の存在比を求めるために、Sr-90の娘核種であるイットリウム(Y)-90と放射平衡になるまでの3週間待たねばならない。このような状況を鑑み、我々は、β線計測を伴わずに分析ができる、ジピコリン酸MALDI質量分析法による迅速放射性Sr検出法を考案した(特願2012-012857)。質量数すなわち陽子と中性子の数の和が90となる核種は、短半減期のものを含めると13種類存在する。質量数89と90の核種のうち、半減期が24時間以上の核種は、Sr、Y、ジルコニウム(Zr)の3種類の元素のみであることから、Y、Zrを弁別してSrのみをイオン化し、質量分析を行えば、迅速測定が可能となる。本手法は原理的に長半減期核種に対してより有効になる。Sr-90の半減期は、28.8年であるが、β線計測での1ベクレル当たり、原子数として約 1.3×10^9 個(2.2fmol)の崩壊を待つ全Sr-90の量に相当している。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析法では、試料となる有機物はマトリックスと呼ばれる有機化合物と混合された状態でレーザー光を照射される。マトリックスがレーザーのエネルギーを吸収すると、試料分子も一緒に巻き込まれてイオン化する。ジピコリン酸MALDI質量分析では、新たなSr検出用のマトリックスとして、ジピコリン酸という、納豆菌に多く含まれる安価で安定な化合物を導入した。これにより、ジピコリン酸によく結合するSrなど2価のイオンを優先的にイオン化できることが明らかになっていた(図1)。実験手法は通常のMALDI質量分析法と同様簡便である。Srを検出する場合はイオンの混合液にマトリックスであるジピコリン酸溶液を加え、MALDI質量分析装置のサンプルプレートに滴下、乾燥した後、装置に導入して質量分析を行う。図2はマグネシウムやカリウム(K)を不純物として含む安定同位体のSr-88を分析した例である[2]。KやMgもピークとして観測されるが、質量が大きく異なるためSr測定のためには妨げにはならない。挿入図では、Sr-88に加え、安定同位体のSr-86、Sr-87が、存在比に応じた強度で観測されていることがわかる。Sr-90の定量の際にはSr-88を内部標準として用いることができる。

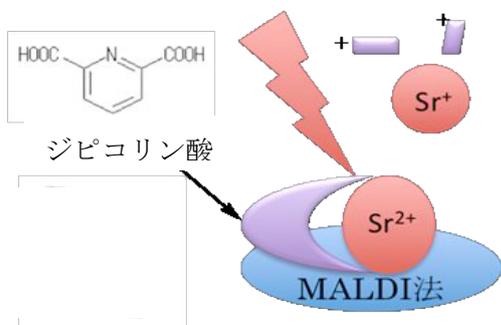


図1 MALDIの原理

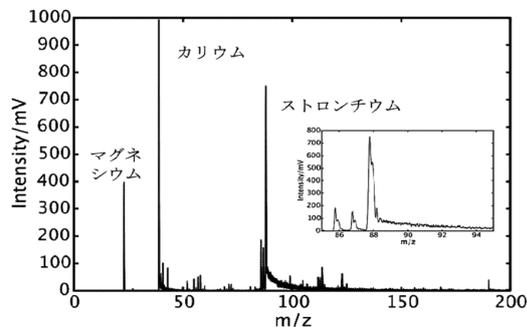


図2 MALDI-TOF-MSによるイオンの分析

本研究では、特にジピコリン酸MALDI-TOF-MS技術の核となる、ジピコリン酸という有機物とイオンの相互作用の調査を行中心に、ジピコリン酸MALDI-TOF-MSの実用化に向けて、本手法によるSr、Y、Zrイオンのピークの観測のしやすさの違いの原因について、実験的な検討を行った。

3. 研究の方法

MALDI-TOF-MS で微量分析を目指すうえで、マトリックスであるジピコリン酸と、試料となるストロンチウムなど、金属イオンとの相互作用の解明が必須である。以前に、紫外可視吸収スペクトルを用いて、ジピコリン酸への Sr 滴定実験を行ったが、Sr 添加に伴うジピコリン酸の吸収スペクトルの変化は微小で、両者の結合定数を求めるなどの精密解析は難しかった。そこで、吸収スペクトルに代わる相互作用の解析法として、核磁気共鳴(NMR)法 を利用することとし、 Sr^{2+} 、 Y^{3+} および Zr^{4+} イオンとジピコリン酸がどのような相互作用をしているか、解析を行った。

実験には主として、図 1 に構造を示した 2 位と 6 位にカルボン酸を持つジピコリン酸を使用した。ジピコリン酸を選択したのは、通常の MALDI-TOF-MS に頻用されているマトリックスと構造が類似しているため、当時使用していた日本電子の MALDI-TOF-MS 装置 (AXIMA) に搭載されていた窒素レーザーの波長 (377nm) でイオン化されるであろうと考えたことと、納豆などの食品に含まれる安価で安全な物質であるため、本実験の実施者となりうる高校生や高専生にも安全管理や取り扱いができると考えたからである。10mM のジピコリン酸に対して、 Sr^{2+} 、 Y^{3+} および Zr^{4+} イオンがさまざまなモル比になるよう塩化ストロンチウム、塩化イットリウム、塩化ジルコニウムを加えて混合し、測定試料とした。

(1) $^1\text{H-NMR}$ によるジピコリン酸とイオンの相互作用解析

NMR 測定には、日本電子の JEOL-JNM-ECX400II を使用した。MALDI-TOF-MS の試料調製の際、ジピコリン酸と各イオンは水溶液中で混合し、乾燥させる。水溶液中での露湯社の相互作用がイオン化のしやすさに影響を及ぼしていると考えられるため、NMR 測定も水中で行う必要があった。そこで本実験では、タンパク質の NMR 測定の際に用いる溶媒中のプロトンのシグナルを低減する「水消し」を含むパルスプログラム wgh_dpfgse を用いてデータを取得した。pH により相互作用の様式が変化すると考えたので、NMR 測定は 50mM の酢酸緩衝液 pH5.0 中で行った。

(2) 液体クロマトグラフィー法 (HPLC) によるジピコリン酸と Sr^{2+} イオンの相互作用解析

MALDI-TOF-MS の試料とマトリックス分子の相互作用は、試料作成の際の溶液中、試料プレート上で乾燥させた時の固体中、イオン化の際の真空中と、条件の異なる各段階での相互作用の強さのどれもが最終的なイオン化効率に影響を及ぼしうると考えられる。MALDI-TOF-MS の試料作成時には、試料の他に、サンプルプレート上での迅速な溶液揮発を促すための少量の有機溶媒と、試料のイオン化を促すための揮発性の酸を添加することが多い。そこで、本実験では溶離液にメタノールと酢酸緩衝液を加え、ジピコリン酸と各イオンの混合液の分析を行い、溶出曲線の比較を行った。

4. 研究成果

(1) $^1\text{H-NMR}$ によるジピコリン酸とイオンの相互作用解析

図 3 に、50 mM 酢酸緩衝液 pH5.0 中でのジピコリン酸の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。ジピコリン酸の濃度を 1 として、添加した金属塩化物の濃度を 0.0 (青)、0.25 (橙)、0.50 (緑)、1.0 (赤) と変化させた結果を重ね書きしてある。

全てのスペクトル中で最も低磁場側 (左側) にピークが観測されている青色のスペクトルが、ジピコリン酸のみの時に観測されたものである。強度の強いダブルレットがジピコリン酸の 3 位と 5 位の炭素に結合している水素、トリプレットが 4 位の水素のピークである。(a) の Sr^{2+} を添加したデータでは、 Sr^{2+} の添加量に伴ってピークが高磁場側にシフトした。そして、 Sr^{2+} の添加量がジピコリン酸に対してモル比で 1.0:1.0 になると、5 本のピークが赤色の 1 本のピークに集約され、その後は Sr^{2+} を過剰に添加してもスペクトルに変化は観測されない

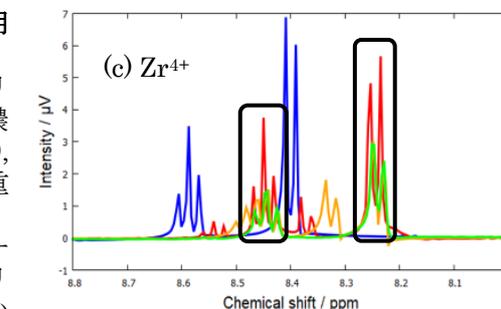
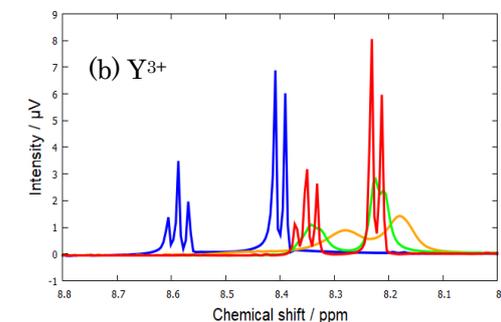
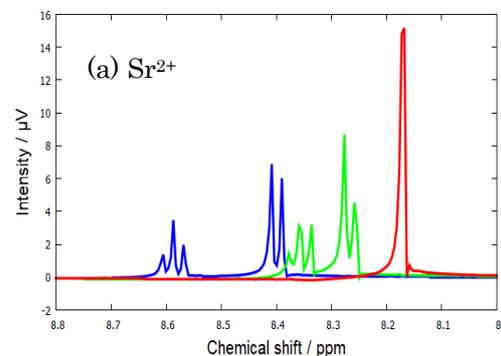


図 3 ジピコリン酸と(a) Sr^{2+} , (b) Y^{3+} , (c) Zr^{4+} の混合溶液の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

10 mM のジピコリン酸に対して、1.0:0 (青)、1.0:0.25 (橙)、1.0:0.50 (緑)、1.0:1.0 (赤) のモル比で各イオンを混合した。

ことがわかった。

これに対して図3 (b)の Y^{3+} と (c)の Zr^{4+} では、 Sr^{2+} の場合とは異なる相互作用を示唆するデータが得られた。図3 (b)の Y^{3+} では、ジピコリン酸 1.0 に対して Y^{3+} をモル比で 0.25 当量を添加した時、大きな broadening が観測されたが、 Y^{3+} を 0.5 当量まで増加させると broadening の影響が軽減され、1.0:1.0 では、ピーク位置は全体的に高磁場シフトしているものの、ジピコリン酸のみの時と同程度の線幅と強度を回復していることがわかる。0.25 当量で顕著に観測された NMR ピークの broadening は、低分子有機化合物がタンパク質のような大きな分子量の分子と結合した時などにも観測され、本実験でも、観測中のジピコリン酸分子が、 Y^{3+} を加えることによって多量体化したことにより引き起こされたと考えられる。図3 (c)の Zr^{4+} では、黒線で囲った分子種の他に、少なくとももう1種の別の分子種が確認できるため、2種類以上の異なる複合体分子種が形成されていることがわかった。

ジピコリン酸に Sr^{2+} を加えた場合のみ、イオンを 1:1 で添加することで、ジピコリン酸の3位と5位の水素のケミカルシフト値が4位の水素と一致して1本のピークとして観測されている。これに対して、 Y^{3+} と Zr^{4+} を加えた場合は、3位と5位の水素のケミカルシフト値は4位との違いを残したまま高磁場シフトをした。 Sr^{2+} 、 Y^{3+} 、 Zr^{4+} ではイオン半径が 2.36、1.80、1.08 Å と大きく異なること、ジピコリン酸のカルボン酸の pKa を考慮すると、pH5.0 では2価の負イオンとなることから、金属イオンの価数の違いもジピコリン酸と各イオンとの結合様式の違いに影響を及ぼしているのではないかと考えられる。

(2) 液体クロマトグラフィー法 (HPLC) によるジピコリン酸とイオンの相互作用解析

NMR 測定に使用した、ジピコリン酸と3種類の塩化物の混合溶液中での、ジピコリン酸と金属イオンの相互作用の状態を調査するため、これらの試料の HPLC 分析を行った。カラムは陽イオン分析用のイオンクロマトグラフィーカラム IC YS-50 を使用し、272nm での吸光度と電気伝導度で溶出液をモニターした。

図4がジピコリン酸と各イオンの混合溶液の吸光度による分析結果である。ジピコリン酸の吸収波長で観測しているため、ジピコリン酸の溶出時刻をモニターしているといえる。赤色以外の曲線は、(a)は Sr^{2+} 、(b)は Y^{3+} 、(c)は Zr^{4+} との相互作用の影響を受けていると考えられる。1min 付近にインジェクションショックと思われるピークが観測されているのと、2min 以降に緩やかなテールを引いているのは、溶離液として、75%のメタノール水溶液を用いているためと考えられる。

各図の赤線はジピコリン酸のみを酢酸緩衝液に溶解した試料のデータである。この時点でピークが2つに分かれて観測されていることがわかる。これに $SrCl_2$ を添加すると、早い方の溶出ピークが小さくなる傾向が見られたのに対し、 YCl_3 を添加すると、逆にこの早く溶出するフラクションが増加することがわかった。一方、 $ZrCl_4$ を添加した場合は、ジピコリン酸に対して 0.25 当量の $ZrCl_4$ を添加した時点で半量、0.50 当量の $ZrCl_4$ を添加した時点で全量の分子が、このカラムとはほとんど相互作用せず、早い時刻 (溶出時刻 1min 程度) に一気に溶出してしまっていると考えられる。このことから、Zr に関しては、 Zr^{4+} イオン1つに対してジピコリン酸が2つ配位する配位結合を形成している可能性が示唆された。

ジピコリン酸と Y^{3+} 、および Zr^{4+} を含む混合溶液の NMR の結果には、顕著な経時変化が観察された。図3および図4に示したデータは、試料溶液調製後間もなく得られたものであるが、特に、高い濃度で測定を行う NMR では、 Y^{3+} 、および Zr^{4+} の添加後に、時間の経過とともにピークが観測されなくなるなどの変化が観測された。MALDI-TOF-MS では、大きな分子量を持つ分子や多量体化しやすい分子ではイオン化が難しくなる傾向があることから、ジピコリン酸をマトリックスとして使用した MALDI-TOF-MS で Sr と比較して Y や Zr がイオン化され難かったのは、これらのイオンとの間で形成される複合体の多量体化し易さが影響していたのではないかと考えられる。

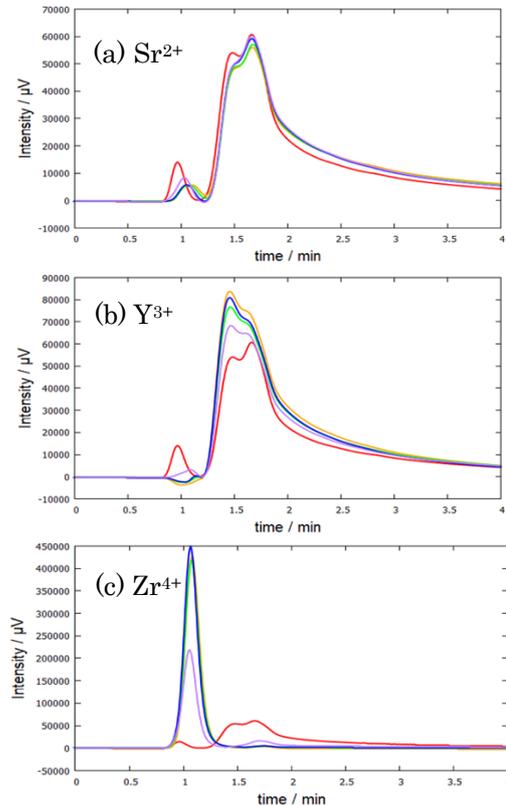


図4 ジピコリン酸と (a) Sr^{2+} 、(b) Y^{3+} 、(c) Zr^{4+} の混合溶液の HPLC 溶出曲線

1.0 mM のジピコリン酸に対して、1.0:0.0 (赤)、1.0:0.25 (紫)、1.0:0.50 (青)、1.0:0.75 (緑)、1.0:1.0 (橙) のモル比で各イオンの塩化物を混合した試料をインジェクションした。赤は酢酸緩衝液にジピコリン酸のみを入れたもの。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuki Takaku, Kaori Chiba
2. 発表標題 NMR and HPLC analysis of the interactions between dipicolinic acid and three ions, Sr, Y, and Zr
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 高久 侑己、千葉薫
2. 発表標題 ジピコリン酸を用いた放射性Srの迅速検出法
3. 学会等名 第30回 日本化学会関東支部 茨城地区研究交流会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小池 正記 (KOIKE Masaki) (00356958)	広島工業大学・工学部・教授 (35403)	