

メルクリオフルオレセインと硫化物イオンの 消蛍光反応の分析化学的知見

——水試料中の硫化物イオンの定量——

合田四郎， 森重清利， 山田延正， 岡竹 充， 西川泰治^{Ⓐ*}

(1985 年 11 月 25 日受理)

アセトキシメルクリオフルオレセイン (AMF) 並びにマーキュロクロム (MC) の硫化物イオンによる消蛍光反応を検討し，その消光機構を明らかにした。pH 10 で AMF と S^{2-} の結合比は 1:1，又，MC とは 2:1 錯体を形成し，メルクリオフルオレセインの蛍光は静的消光する。この消蛍光反応を利用して $(0.5\sim5)\times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (MC 法)， $(1\sim10)\times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ の硫化物イオンが誤差 2% 以内で迅速，簡便に定量できる。AMF 法では鉄(II, III)，マンガン(II) が硫化物イオンの 100 倍量共存すると妨害する。MC 法ではマンガン(II) の影響は認められない。これら鉄(II, III)，マンガン(II) 共存下で水中の微量硫化物イオンを直接定量できることを明らかにした。

1 緒 言

先にフルオレセインの 4 あるいは 5 位にアセトキシメルクリオ基 ($\text{CH}_3\text{OCOHg}^-$) やヒドロキシメルクリオ基 (HOHg^-) を配した 4,5-ビス (アセトキシメルクリオ) フルオレセイン (AMF と略す) 及び マーキュロクロム (2,7-ジブromo-4-ヒドロキシメルクリオフルオレセイン; MC と略す) の化学構造とその光ルミネセンス特性との関係について報告した¹⁾。AMF の蛍光は硫化物イオンにより特異的に消光するので，ppb レベルの硫化物イオンの消蛍光定量に利用されている²⁾³⁾。田中らは大気中の硫化水素の定量に AMF を用い，ppb レベルの硫化水素を簡便に定量する方法を提出している⁴⁾。しかし，その消光機構並びに消光能などに関する基礎的な検討はあまりなされていない。著者らは MC が AMF と同様に硫化物イオンに対して強い消蛍光反応を示すことを見いだした。そこでこれらメルクリオフルオレセイン類の硫化物イオンに対する消蛍光反応の機構と消蛍光能について比較検討し，硫化物イオンの消蛍光定量法に関する分析化学的知見を得るとともに，従来より繁用されている AMF 法より MC 法が感度及び妨害元素の影響が少なく優れていることを明らかにした。そこで，これらの消蛍光反応を利用した水中硫化物イオンの定量法を

確立した。

2 実 験

2.1 試 薬

AMF 試薬溶液：Sigma 製 AMF 8.4mg を 0.1 mol dm^{-3} 水酸化ナトリウム溶液 50 cm^3 に溶かし $2\times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ AMF 溶液を調製，これを 0.1 mol dm^{-3} 水酸化ナトリウム溶液で希釈し $1\times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ AMF 溶液として使用した。暗所に保存すれば少なくとも 2 週間は安定である。

MC 試薬溶液：山善薬品製 MC ($\text{C}_{20}\text{H}_8\text{Br}_2\text{HgNa}_2\text{O}_6$) 7.5mg を蒸留水 50 cm^3 に溶かし， $2\times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ MC 溶液としこれを希釈して使用した。

硫化ナトリウム標準溶液：硫化ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 約 6g を採り，水 500 cm^3 に溶解し，これを原液とした。原液の硫化ナトリウムの標定はヨウ素滴定法によった⁵⁾。

緩衝溶液： 0.1 mol dm^{-3} 炭酸ナトリウム- 0.1 mol dm^{-3} 炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 10) を調製し，この緩衝溶液を用いて試料溶液を作製した。

フルオレセインナトリウム (ウラニン) 標準溶液： $0.1\sim 0.5 \mu\text{g cm}^{-3}$ フルオレセインナトリウム水溶液を調製し，分光蛍光光度計のセッティングのための対照標準溶液とした。

2.2 装 置

蛍光スペクトル並びに蛍光強度の測定には日立分光蛍光光度計 204 型 (150 W キセノンランプ，R-212 光電子増倍管) を使用し，又，補正蛍光スペクトル及び蛍光寿命の測定には日立分光蛍光光度計 MPF-2A 型に同付

* 近畿大学理工学部化学教室：577 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

属蛍光スペクトル補正装置並びに同社製時間分解測光装置をセットして使用した (150 W キセノンランプ, 446 UR 光電子増倍管)。

吸収スペクトルの測定には日立自記分光光度計 333 型を使用した。

2.3 一般操作

AMF 法: 硫化物イオン $(0.1 \sim 10) \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ を含む溶液 2 cm^3 に $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ AMF 試薬溶液 2 cm^3 を加え, 緩衝溶液を用いて全容を 20 cm^3 とし (pH 10), よく振り混ぜた後, 498 nm の光で励起し, 522 nm の蛍光強度をフルオレセインナトリウム対照標準溶液 ($0.1 \mu\text{g cm}^{-3}$) 25 目盛りセットを対照に測定する。

MC 法: 硫化物イオン $(0.1 \sim 5) \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ を含む溶液 2 cm^3 に $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ MC 試薬溶液 2 cm^3 を加え, AMF 法と同様に操作して得られた溶液について, 508 nm の光で励起し, 532 nm の蛍光強度を $0.5 \mu\text{g cm}^{-3}$ フルオレセインナトリウム対照標準溶液 48 目盛りセットを対照として測定する。

3 結果及び考察

3.1 励起, 蛍光スペクトル

AMF の $7 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ 溶液並びに $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ MC 溶液の pH 10.5 における励起, 蛍光スペクトル (未補正) を求めた結果を Fig. 1 に, 又, 吸収スペクトル及び補正蛍光スペクトルの極大波長を Table 1 に示した。

Fig. 1 並びに Table 1 の結果より分かるように, メルクリオ基や臭素のような重原子を導入すると励起 (吸収), 蛍光スペクトルは基本型のフルオレセインよりいずれも長波長側に移行し, その置換基効果はスコット則⁶⁾に従う。AMF と MC とを比較するとフルオレセインの 1,8 位に臭素を置換した MC の励起, 蛍光スペクトルのほうが AMF より長波長側に移行している。本研究では硫化物イオンの定量を目的としたので, 蛍光強度の測定には AMF, MC いずれの場合も未補正ス

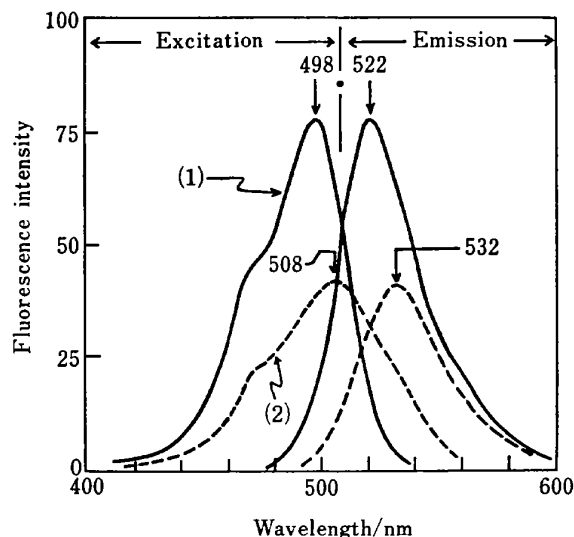


Fig. 1 Excitation and emission spectra of acetoxymercuriofluorescein (AMF) and 2,7-dibromo-4-hydroxymercuriofluorescein (MC) (uncorrected)

(1) AMF: $7 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ in $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH 10.5), 17°C ;
(2) MC: $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ in $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH 10.5), 15°C

ペクトルの極大波長 AMF: Ex. 498 nm/Em. 522 nm, MC: Ex. 508 nm/Em. 532 nm を用いた。

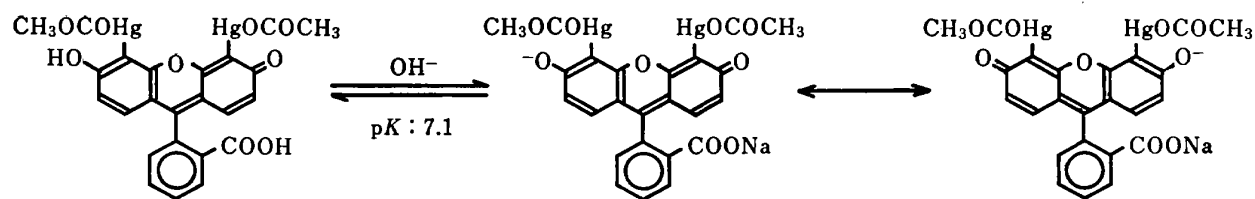
3.2 pH の影響

AMF 並びに MC の pH と蛍光強度との関係を検討した結果を Fig. 2 に, 又, それぞれの吸収極大波長 (AMF: 495 nm, MC: 508 nm) における吸光度と pH の関係から吸光度法的に Hildebrand プロット法⁷⁾により各試薬の酸解離定数を求めた結果を Fig. 3 に示した。その結果, AMF 及び MC はそれぞれ $\text{p}K: 7.1_0$, $\text{p}K: 4.7_8$ であり, Table 1 から分かるように, 塩基性溶液における積分吸収強度並びに振動子強度は共に高値を示す。従って Fig. 2 に示したように AMF は pH 8.5~12, MC は pH 7~12 の塩基性領域において一定の最大蛍光強度を示す。これは Scheme 1, 2 に示すよ

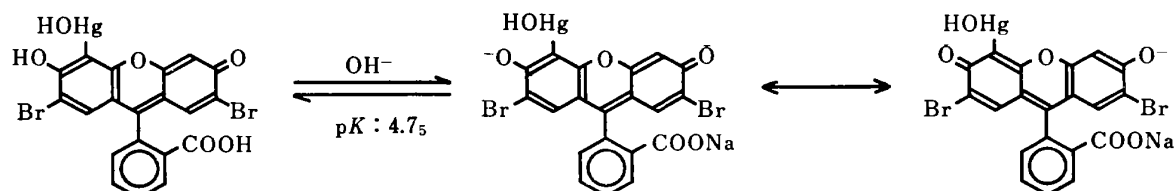
Table 1 Absorption and fluorescence properties of mercuriofluoresceinates

Compound	pH	Absorption			Fluorescence				
		$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\int \epsilon d\nu^a) \times 10^3$	$f^b)$	Em. max/nm	ϕ_f	F.S.I. ^{c)} , $\times 10^{-2} \mu\text{m}$	$\tau_f^d)/\text{ns}$	$\sum \xi^2, \times 10^7$
Fluorescein	10	490	1.4	0.61	513	0.97	14.8	7.2	—
AMF	5.1	455	0.9	0.41					
	11.5	495	1.7	0.74	530	0.35	1.54	5.6	1.68
MC	3.0	480	0.3	0.15					
	9.0	508	1.3	0.60	533	0.28	0.76	5.8	2.05

a) Integrated intensity of absorption, b) Oscillation strength, c) Fluorescence sensitivity index $= \phi_f D_1 / H^8)$, d) Fluorescence lifetime



Scheme 1



Scheme 2

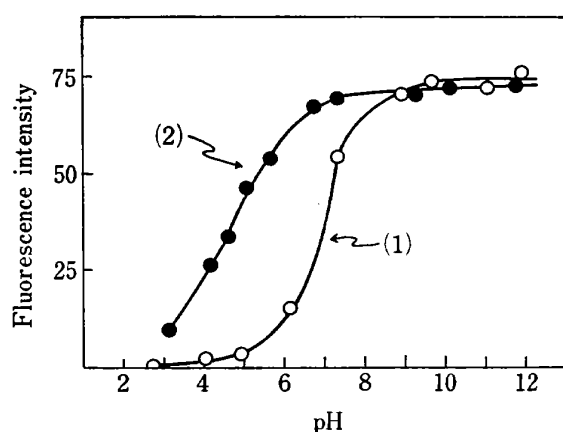
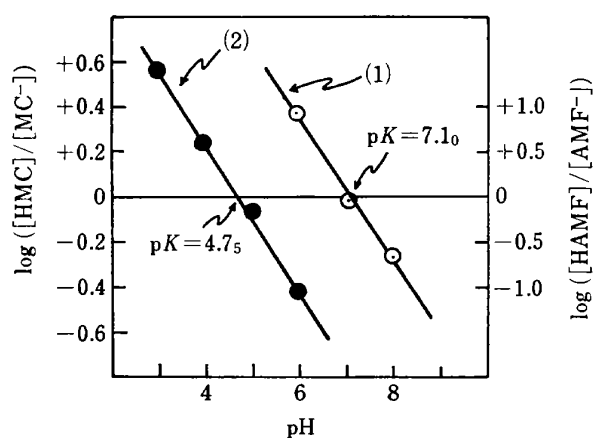
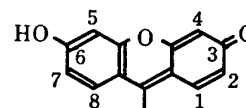


Fig. 2 Effect of pH on fluorescence intensity

(1) : AMF 1×10^{-6} mol dm $^{-3}$; (2) : MC 1×10^{-6} mol dm $^{-3}$

Fig. 3 Change in $\log([HA]/[A^-])$ with pH

$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$, $pH = pK_a - \log([HA]/[A^-])$; [HA] : Concentration of AMF and/or MC; (1) : AMF, (2) : MC



Scheme 3

うに、塩基性領域では通し共役電荷共鳴構造（対称キノイド構造）の分子種の分光特性の寄与によるものと解釈できる¹⁾。そこで硫化物イオンとこれらメルクリオフルオレセインとの消蛍光反応は、最大蛍光強度を示す pH 10 付近を選定した。

3.3 メルクリオフルオレセインの蛍光特性

一般にキサントン色素の母核 6-ヒドロキシ-3H-キサントン-3-オン (Scheme 3) は共鳴の結果、2,4,5,7-位で二重結合原子の電子密度が大きく、1,3,6,8-位で電子密度が小さい。従ってフルオレセインのように電子供与性の OH 基（助蛍光団： $+M_f$ 基）が電子密度の小さい 6-位に 1 個結合する場合は蛍光性上都合がよく、Table 1 に示したように蛍光の量子収率 ϕ_f : 0.97 と大きい。このフルオレセインの 4 あるいは 5-位に電子吸引性のアセトキシメルクリオ基を置換した AMF 及び 2,7-ジブromoフルオレセイン ($\phi_f \approx 0.37$) にヒドロキシメルクリオ基が置換した MC は、共鳴阻害が起こらないのでいずれも蛍光性である。ただし、AMF, MC いずれの試薬もメルクリオ基を置換しているため、その重原子効果により ϕ_f はフルオレセインに比し減少している。又、MC は重原子であるメルクリオ基 1 個と臭素原子 2 個、合計 3 個の重原子を有するので、アセトキシメルクリオ基 2 個を有する AMF より重原子効果の影響が大きく、その ϕ_f は低い。重原子の ϕ_f に及ぼす影

響はスピン-軌道カップリング定数の総和 $\sum \zeta^2$ (Table 1 参照) よりも肯定できる. しかし, Table 1 より分かるように AMF, MC のそれぞれの蛍光の感度指標 F. S. I. は $1.54 \times 10^{-2} \mu\text{m}$, $0.76 \times 10^{-2} \mu\text{m}$ と大きく, 強い蛍光性を示す試薬である.

3.4 硫化物イオンによる消光反応と検量線

2.3 の一般操作法に従い硫化物イオンの消光反応による検量線を求めた結果を Fig. 4 に示した. $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ の AMF あるいは MC に対し, AMF 法では $(0.5 \sim 10) \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ の硫化物イオン, 又, MC 法では $(0.5 \sim 5) \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ の硫化物イオン

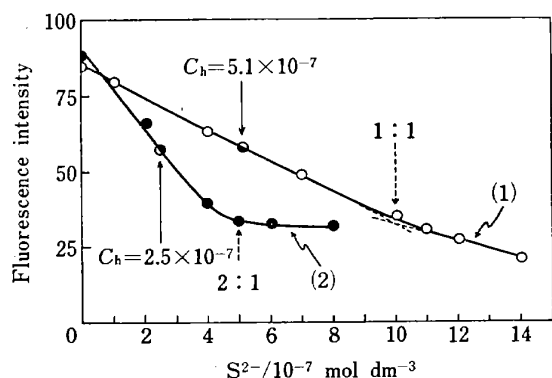


Fig. 4 Calibration curves for sulfide ion

(1): AMF ($1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$), 498/522 nm, $0.1 \mu\text{g cm}^{-3}$ Uranine 25 div.; (2): MC ($1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$), 508/532 nm, $0.5 \mu\text{g cm}^{-3}$ Uranine 48 div.; C_h : Concentration of half fluorescence quenching

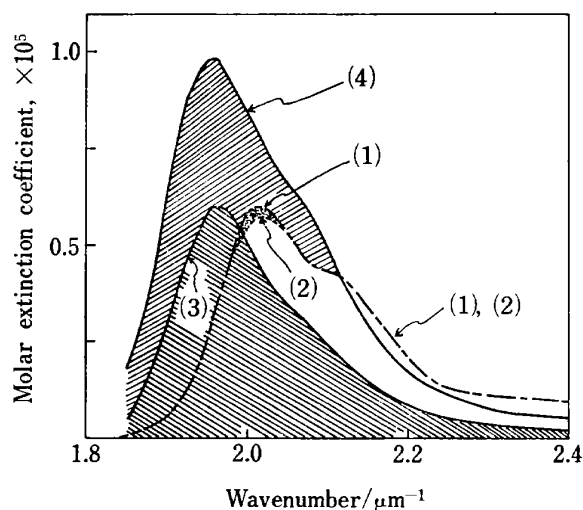


Fig. 5 Absorption spectra of AMF, MC and the sulfides complex

(1): AMF, (2): AMF-sulfide complex, (3): MC, (4): MC-sulfide complex

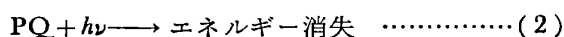
濃度で, 蛍光の消光度と硫化物濃度との間には Fig. 4 に示したようにほぼ直線に近い曲線を示す. しかし, Fig. 4 には示さなかったが $5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ 以下の硫化物イオン濃度では検量線は大きく湾曲する. 本消光反応の検量線の屈曲点は「試薬」:[硫化物イオン]濃度の比が AMF 法では 1:1, 又, MC 法では 2:1 に近似し, これは試薬と硫化物イオンの反応比に相当することを示唆する. この事実を確かめるため, AMF 及び AMF: $\text{S}^{2-} = 1:1$ 並びに MC 及び MC: $\text{S}^{2-} = 2:1$ の反応溶液の吸収スペクトルを測定し, 積分吸収強度 $\int \epsilon d\nu$ と振動子強度 f を算出した (Fig. 5 参照). その結果

$$\left. \begin{array}{l} (1) \text{ AMF } (1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}): \\ \int_{1.85}^{2.40} \epsilon d\nu = 1.39 \times 10^8 \quad f = 0.599 \\ (2) \text{ AMF} + \text{S}^{2-} (1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}): \\ \int_{1.85}^{2.40} \epsilon d\nu = 1.37 \times 10^8 \quad f = 0.593 \\ (3) \text{ MC } (1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}): \\ \int_{1.85}^{2.40} \epsilon d\nu = 1.17 \times 10^8 \quad f = 0.504 \\ (4) \text{ MC } (1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}) : \\ \text{S}^{2-} (5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}) \left. \vphantom{\int} \right\} : \\ \int_{1.85}^{2.40} \epsilon d\nu = 2.21 \times 10^8 \quad f = 0.954 \end{array} \right\}$$

となり, (1), (2) の f 値より AMF と S^{2-} の結合比は 1:1, 又, (3), (4) の f 値より MC と S^{2-} の結合比は 2:1 であることが肯定できた.

一般に純蛍光物質の溶液の蛍光強度を半減させるに必要な消光物質の濃度を, 半蛍光消失濃度 C_h と呼び, 消光物質の消光能を比較する尺度として用いる⁹⁾. Fig. 4 の結果より $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ の AMF 及び MC に対する硫化物イオンの C_h はそれぞれ $5.1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, $2.5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ である. この結果よりも硫化物イオンとの結合比はそれぞれ 1:1, 2:1 となることが立証される. 更に硫化物イオンによる消光能は MC のほうが AMF より 2 倍大きく, MC 法が 2 倍の高感度で硫化物イオンを定量できることを明らかにした.

通常, 基底状態の蛍光性分子 P と消光分子 Q との間に緩い結合をした錯合体 PQ を生じ, これが蛍光性をもたないために起こる消光は静的消光 (static quenching) として理解される.



本研究における AMF, MC はいずれも硫化物イオンと励起前に強い錯体 (1:1 錯体, 2:1 錯体) を形成し, これが蛍光性をもたないために起こる消光で, 広義には静的消光として取り扱って差し支えない。

静的消光における蛍光強度の変化と消光剤の濃度との関係 (検量線) は, 指数曲線を示す場合が多い。メルクリオフルオレセイン類と硫化物イオンとの消蛍光反応の検量線 (Fig. 4) も, 微視的には指数曲線である。このような場合, 蛍光強度と消光剤濃度との関係は式 (3) で示される。

$$F = F_0 e^{-k'c} \quad (3)$$

ここで F_0 は消光剤が存在しない場合の蛍光強度, F は消光剤濃度が C のときの蛍光強度, k' は定数である。

又, 半蛍光消失濃度 C_h と k' の間には式 (4) の関係が成立する。

$$C_h = \frac{\ln 2}{k'} = \frac{0.693}{k'} \quad (4)$$

式 (1) において錯合体生成の平衡定数を K とすれば

$$[PQ] = K[P][Q] \quad (5)$$

となる。一方, 吸収光の P 及び PQ への分配はそれぞれ $[P]/([P] + [PQ])$, $[PQ]/([P] + [PQ])$ であり, P は蛍光性であり, PQ は無蛍光性であるから, Q の存在しないときの蛍光強度 F_0 が Q の添加により F に低下したとすれば式 (6) が成立する。

$$(F_0 - F)/F = K[Q] \quad (6)$$

式 (6) の K は静的消光定数に相当し, 一般には K は 1~10 の間にあるのを特長とする。又, 式 (4) の関係から C_h の逆数が静的消光式 (6) の K になることを意味する。

$1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ の AMF 及び MC の硫化物イオンによる半蛍光消失濃度はそれぞれ $5.1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, $2.5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ であるから, 式 (4), (5), (6) より相当する消光反応の定数 K は $K_{\text{AMF-S}} = 1.96$, $K_{\text{MC-S}} = 4.0$ となる。励起蛍光性分子 P^* が消光分子 Q と衝突してエネルギーを失活する消光, いわゆる動的消光の消光定数 k {式 (9) 参照} は 10~100 のオーダーの値をとることを考慮すれば, 本消蛍光反応は典型的な静的消光反応であると帰属できる。

このような静的消光反応を利用し, メルクリオフルオレセインの濃度を $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ として, AMF 法では $(1 \sim 10) \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ の硫化物イオンが, 又, MC 法では $(0.5 \sim 5) \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ の硫化物イオ

ンが相対標準偏差 2% 以内 {AMF 法: $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3} \text{ S}^{2-}$ につき R. S. D. = 1.96% ($n=3$); MC 法: $2.5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3} \text{ S}^{2-}$ につき R. S. D. = 2.0% ($n=3$)} で精度よく定量できる。

3.5 共存塩の影響

AMF 法並びに MC 法により硫化物イオンを定量する際の, 共存塩の影響について検討した結果を Table 2 に示す。AMF 法, MC 法いずれの場合も硫化物イオンに対し 100 倍量の亜硝酸, 硝酸, 亜硫酸, 硫酸, クロ

Table 2 Effect of diverse ions on sulfide analysis with mercuriofluorescences

Divers ion	Added as	Divers ion S ²⁻	AMF method		MC method	
			F.I. ^{a)}	Error, %	F.I. ^{a)}	Error, %
—	—	—	64.0 ^{b)}	—	54.0 ^{c)}	—
Cl ⁻	NaCl	10	62.9	+1.7	53.8	+0.4
		100	63.5	+0.8	54.2	-0.4
		1000	62.9	+1.7	53.5	+0.9
NO ₃ ⁻	NaNO ₃	1	66.4	-3.8	—	—
		10	66.8	-4.3	53.4	+1.1
		100	68.5	-7.0	53.0	+1.9
NO ₂ ⁻	NaNO ₂	1	64.5	-0.8	—	—
		10	64.0	—	53.5	+0.9
		100	63.5	+0.8	54.5	-0.9
SO ₄ ²⁻	Na ₂ SO ₄	10	61.9	+3.7	54.5	-0.9
		100	62.6	+2.2	55.6	-3.0
SO ₃ ²⁻	Na ₂ SO ₃	10	61.9	+3.7	53.3	+1.3
		100	62.6	+2.2	53.8	+0.4
PO ₄ ³⁻	Na ₃ PO ₄	10	64.5	-0.8	53.3	+1.2
		100	64.5	-0.8	52.3	+3.1
CrO ₄ ²⁻	K ₂ CrO ₄	10	65.0	-1.5	54.8	-1.5
		100	64.5	-0.8	53.0	+1.9
Mg ²⁺	MgSO ₄	10	64.0	—	53.8	+0.4
		100	63.0	+1.6	53.2	+1.5
Co ²⁺	CoSO ₄	10	65.2	-1.8	54.9	-1.6
		100	65.2	-1.8	54.6	-1.1
Mn ²⁺	MnSO ₄	5	64.0	—	—	—
		10	63.4	+1.0	55.8	-3.3
		100	50.2	+22.6	52.5	+2.8
		10	63.5	+0.8	—	—
		15	—	—	52.5	+2.8
Fe ³⁺	Fe ₂ (SO ₄) ₃	100	52.1	+18.6	—	—
		300	—	—	51.1	+5.1
		1000	—	—	45.6	+15.6
		10	—	—	39.5	+26.9
Fe ²⁺	(Fe ³⁺ + NH ₂ OH)	150	—	—	—	—
		10	67.6	-5.6	54.9	-1.6
Zn ²⁺	Zn(CH ₃ COO) ₂	10	67.0	-4.7	54.6	-1.1
		100	67.0	-4.7	54.6	-1.1

a) F. I.: Fluorescence intensity. b) $(1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ AMF}) + (4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ S}^{2-}) = 64.0$; $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ AMF} = 86.0$. c) $(1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ MC}) + (3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ S}^{2-}) = 54.0$; $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ MC} = 88.0$

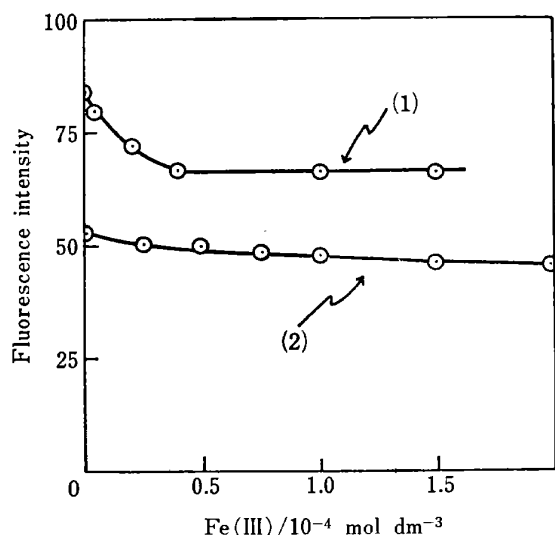
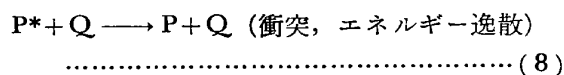


Fig. 6 Quenching of AMF and MC by iron(III) on fluorescence

(1) : AMF (1×10^{-6} mol dm⁻³), 498/522 nm, 0.1 μ g cm⁻³ Uranine 25 div.; (2) : MC (1×10^{-6} mol dm⁻³), 508/532 nm, 0.1 μ g cm⁻³ Uranine 25 div.

ム酸, リン酸, マグネシウム(II), コバルト(II), 亜鉛(II)の各イオンの共存は影響しない。又, 1000倍量の塩化物イオンの共存も差し支えない。AMF法ではマンガン(II)イオンが100倍量共存すると蛍光強度の減少がみられ22.6%の正誤差を与えるが, MC法では大きな影響は認められなかった。鉄(III, II)イオンはAMF法並びにMC法いずれの場合も蛍光を消光させる。Fig. 6に 1×10^{-6} mol dm⁻³のAMF及びMCに対する鉄(III)イオンの消光能を検討した結果を示した。鉄(III)イオンはAMF法では 4×10^{-5} mol dm⁻³以上, 又, MC法では 2.4×10^{-5} mol dm⁻³以上の濃度共存するときは蛍光強度は一定値を示し, 蛍光強度は減少しない。これは溶液のpHが10に保たれているため, この濃度以上の鉄(III)イオンは水酸化物を形成し鉄(III)イオンとしての消光能を示さないことが, 水酸化鉄の溶解度より肯定できる。一般に高スピン型の遷移金属イオンである鉄(II, III)イオン及びマンガン(II)イオンの消光能は, メルクリオフルオレセインに対し消光作用を示す。これは励起蛍光性分子(P*)がこれら消光イオン(Q)と衝突してエネルギーを失活する, 動的消光作用によるものと解せられる。すなわち,



動的消光においてはシュテルン・ホルマーの式(9)が

成り立つ。

$$\frac{F_0 - F}{F} = \frac{k_2[P^*][Q]}{k_1[P^*]} = k[Q] \dots\dots\dots (9)$$

ここで, k_1, k_2 はそれぞれ蛍光放射及び動的消光の速度定数で, k は動的消光の消光定数で式(6)の静的消光の K に対応する。Fig. 6の結果より 1×10^{-6} mol dm⁻³のAMF並びにMCに対する鉄(III)イオンの半蛍光消失濃度はそれぞれ $C_{hAMF} = 1.2 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³, $C_{hMC} = 1.2 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³で, その消光定数はそれぞれ $k_{AMF} = 8890$, $k_{MC} = 1060$ となる。消光定数の値から鉄(III)イオンの消光は動的消光に起因することが肯定できる。又, 鉄(III)イオンのAMFに対する消光能は, その半蛍光消失濃度より分かるようにMCより約10倍大きい($C_{hAMF} \times 10 = C_{hMC}$)。マンガン(II)イオンのこれらメルクリオフルオレセインに対する消光作用も, 鉄イオンと同様に動的消光として理解されるが, その消光能はTable 2より分かるようにAMFにおいて大きく, MCではマンガン(II)イオンの消光はほとんど認められない。これら遷移金属イオンの影響の少ない点でも, 硫化物イオンの定量法としてはMC法がAMF法より優れている。

4 水中硫化物イオンの定量

水中硫化物イオンの定量にAMF法及びMC法を適用し, 簡便, 迅速に定量する方法を検討した。

先に検討した共存イオンを比較的多量に含有する試料として, 兵庫県小沼で採取したかんがい用水沼泥に蒸留水を加え, 30°Cで約1か月間窒素通気し, 嫌気性下で硫黄バクテリアの作用により生成した硫化物イオン(硫化水素)を含む溶液を, 本法により分析した。ちなみに試料溶液中に含有する微量成分を原子吸光法で測定した結果は次のとおりである。亜鉛 3.11 ppb, カルシウム 12.4 ppm, マグネシウム 4.17 ppm, 鉄 10.4 ppm (1.81×10^{-4} mol dm⁻³), マンガン 1.39 ppm (2.53×10^{-5} mol dm⁻³), 又, 有機炭素は 140 ppmであった。

このような鉄, マンガンを含む試料中の硫化物イオンを直接定量するために, 次のような方法を採用した。

定量操作: (1) 試料溶液一定量(1.0~2.0 cm³)を20 cm³のメスフラスコに採り, 一般操作法により硫化物イオンを定量する。同量の試料溶液に一定既知濃度の硫化物イオンを添加した試料を調製し, 同様に硫化物イオンを定量する。

(2) 上記操作と同量の試料溶液を採取し, これに濃塩

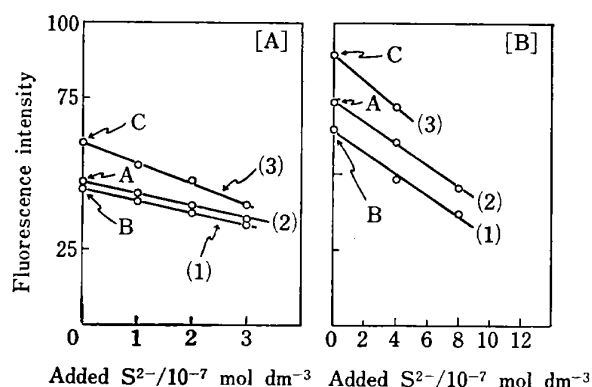


Fig. 7 Analytical curves of sulfide ion in incubated water samples

[A]: MC method, [B]: AMF method. Curve (1): To 1 cm³ of sample solutions were spiked with definite amount of sulfide ion, respectively. Curve (2): To 1 cm³ of sample solutions were added with 4 drops of conc. HCl and boiling, respectively. Curve (3): Calibration curves of sulfide ion. (Point A)-(Point B): Quenched fluorescence intensity of sulfide ion in sample solution

酸4滴を加え、加熱し硫化水素を完全に除去した溶液について、(1)と同様に添加法を含めた操作により蛍光強度を測定する。

■結果の一例を Fig. 7 [A], [B] に示す。Fig. 7 の直線(1), (2) は上記(1), (2) の定量操作に対応する。いずれも(1), (2) の直線は完全に平行しているので、次のようにして硫化物イオンの定量ができる。すなわち、A点ならびにB点、及び検量線(3)のC点の蛍光強度をそれぞれ F_A , F_B , F_C とすれば、 $(F_C - F_B)$ = 共存イオンによる消光度、又、 $(F_A - F_B)$ = 試料中の硫化物イオンの濃度に対応する蛍光強度、である。そこで検量線(3)を用いて、 $(F_A - F_B)$ の蛍光強度に相当する硫化物イオン濃度を算出する。Fig. 7 [A] の試料は通気培養10日後の試料をMC法で、又、Fig. 7 [B] は20日後の試料をAMF法で測定した結果で、それぞれ硫化物イオンとして $7 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $2.5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ という値を示した。このように硫化物イオン濃度の低い試料溶液にはMC法の適用が有利である。

本法はたい積物、鉱物中の硫化物の定量にも適用可能であり、これについては改めて報告する。

本研究の費用の一部は近畿大学研究助成金によった。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 合田四郎, 山崎秀夫, 森重清利, 西川泰治: 日化, **1984**, 1383.
- 2) H. D. Axelrod, J. H. Cary, J. E. Bonelli, J. P. Lodge: *Anal. Chem.*, **41**, 1856 (1969).
- 3) F. Karush, N. R. Klinman, R. Marks: *Anal. Biochem.*, **9**, 100 (1964).
- 4) 田中 茂, 橋本芳一, 中村圭吾: 分化, **26**, 241 (1977).
- 5) 石橋雅義: “基礎容量分析法”, 中巻, p. 526 (1965), (富山房).
- 6) A. I. Scott: *Experientia*, **17**, 68 (1961).
- 7) G. Hildebrand, C. Reilley: *Anal. Chem.*, **29**, 258 (1957).
- 8) C. A. Parker, W. T. Rees: *Analyst* (London), **85**, 587 (1960).
- 9) 西川泰治, 平木敬三: “蛍光・りん光分析法”, 日本分析化学会編, p. 36 (1984), (共立出版).

☆

Determination of sulfide ions in water by fluorescence quenching of mercuriofluoresceinates. Shiro GOHDA, Kiyotoshi MORISHIGE, Nobumasa YAMADA, Mitsuru OKATAKE and Yasuharu NISHIKAWA (Faculty of Science and Technology, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka-shi, Osaka 577)

The fluorescence properties of acetoxymercurofluorescein (AMF) and 2,7-dibromo-4-hydroxymercurofluorescein (Mercurochrome; MC) have been studied. Sulfide ion reacts with AMF to form a 1:1 complex, and with MC to form a 1:2 complex at pH 10, respectively. Fluorescence intensities of AMF or MC were decreased exponentially with concentration of sulfide ions. The sensitivity of quenching action of sulfide ion on MC was found to be twice that of AMF. Sulfide ions were determined in the range of $(0.5 \sim 5.0) \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ and $(1 \sim 10) \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ by the fluorescence quenching of MC and AMF in alkaline solution ($1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$), respectively. Sensitive, reliable and simple analytical methods for determination of sulfide ions in water samples were designed.

(Received July 5, 1985)

Keyword phrases

fluorescence quenching of mercuriofluoresceinates by sulfide ion; sulfide ion in water; fluorescence quenching of acetoxymercurofluorescein and mercurochrome.