

ノ ー ト

シッフ塩基化合物によるアルミニウムの時間分解蛍光法

渡辺 邦洋[®], 森上 賢*

(1993年3月22日受理)

1 緒 言

蛍光寿命はそれぞれ蛍光物質固有のものであり、蛍光スペクトル、蛍光量子収率、及び蛍光強度などの他に、蛍光特性を表す重要なパラメーターの一つである。

現在までに蛍光寿命測定による金属分析例は、非常に少なく、8-キノリノールによるアルミニウム、インジウム、マグネシウム、ガリウムの2成分同時定量等に応用されているのが主である^{1)~3)}。しかし、この方法は定量下限が高く微量分析を目的に検討されたものではない。一般の金属蛍光分析法は、金属と有機試薬により蛍光性の錯体を生成させ、励起光の照射下で発光する蛍光の定常光を観測し、定量を行っている。この方法での定量下限は、錯体と試薬から試験液の蛍光強度比に依存している。

一方、錯体の蛍光寿命が長く試薬から試験液と著しい蛍光寿命差があれば、それぞれの蛍光強度が近接する検出限界付近での蛍光減衰曲線に著しい差が観測できる。従って、励起し一定時間経過後の錯体の蛍光強度と試薬から試験液の蛍光強度比は全蛍光強度(定常光によって得られる強度)により求めた比より大きい。それゆえ、サンプリング範囲を適当に調節することはから試験値の低減に有効に働く。すなわち時間分解測定により蛍光寿命差を利用すれば定量下限の低減が期待される。そこでこのような分析法への適用例を探索するためにサリチルアルデヒドと種々のアミン(モノ、ジアミン、アミノ酸、セミカルバゾン、*o*-アミノフェノール)とで生成するシッフ塩基^{4)~8)}とその金属錯体の蛍光寿命差を測定した。又、それらの錯体で最も蛍光寿命差が大きいサリチルアルデヒドとアミノ酸(グリシン)によるアルミニウムの定量に本法を適用し、従来法より定量下限を下げることについて検討した。なお、本法と同様な原理に基づく定量法はユウロピウム錯体における測定法に見られ

る⁹⁾。ここではトレーサーとしてユウロピウムを使用し、バックグラウンドの除去に利用している。この場合、蛍光寿命は600~1000 μ sと長く、特に過剰試薬の影響の除去を目的としたものではない。

2 実 験

2.1 試 薬

アルミニウム(III)標準溶液: 金属アルミニウム(99.99%) 0.5002 gを6 M塩酸20 mlに加熱溶解し、水で500 mlとした。これを0.1 M塩酸で適宜希釈して使用した。

マグネシウム(II)標準溶液: 金属マグネシウム(99.9%以上) 1.0020 gを6 M塩酸30 mlに溶解し、水で正確に1000 mlとした。この溶液を0.1 M塩酸で希釈して使用した。

ベリリウム(II)標準溶液: 硫酸ベリリウム $\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99.9%) 0.9845 gを希硫酸に溶解し500 mlの0.05 M硫酸溶液とした(0.1 mg/ml)。これを0.05 M硫酸で希釈して使用した。

亜鉛(II)標準溶液: 金属亜鉛(99.98%以上) 1.1850 gを塩酸に溶解し、250 mlの塩酸溶液とした。これを0.1 M塩酸で希釈して使用した。

サリチルアルデヒド(Sal): Salは市販品特級(和光純薬工業)を使用した。

アミン及びアミノ酸: 各種アミン及びアミノ酸はいずれも市販特級品あるいはそれに準ずるものを使用した。

シッフ塩基化合物: シッフ塩基誘導体はFreemanら¹⁰⁾の方法により合成し、DMF溶液として使用した。

2.2 装 置

蛍光強度の測定には、150 Wキセノンランプを光源とした島津蛍光光度計RF-540、pHの測定には東亜電波HM-20E型pHメーターを使用した。蛍光寿命の測定には高圧水素フラッシュランプ(10 kHz, パルス半値幅2 ns以下)を光源とした堀場蛍光寿命測定装置

* 東京理科大学理工学部工業化学科: 278 千葉県野田市山崎 2641

NAES-500 (マルチ TAC による時間相関光電子計数法) を使用した。又、一定時間内のカウント数を積算するためにプログラムを一部改良し用いた。時間軸スケールは 0.2 ns/チャンネルで測定した。

2.3 方法

アルデヒド成分としてサリチルアルデヒド (Sal) の DMF 溶液, アミン成分はモノアミン, ジアミン, アミノ酸を水溶液として両成分を混合し, シッフ塩基とした。サリチルアルデヒドセミカルバゾン及びサリチルアルデヒド-*o*-アミノフェノール系のシッフ塩基は合成したものを DMF 溶液として使用した。試薬濃度, pH, 励起蛍光波長は各金属及びアミンの最適条件^{4)~8)}を使用した。又, シッフ塩基錯体及び試薬から試験液の蛍光寿命 (蛍光減衰曲線) は室温で測定した。

蛍光寿命 τ と蛍光強度 F の関係は次式で表される。

$$\ln(F/F_0) = -t/\tau$$

$t=0$ のとき, $F=F_0$ となりこれは減衰以前の蛍光強度を示す。

従来の蛍光寿命差を利用する主な分析法は F_0 を求める切片カウント数により定量している。これについては後述する。本研究では一定のサンプリング時間 (例えば $t=25\sim 50$ ns) での総カウント数から定量することを検討した。

3 結果及び考察

3.1 (Sal+各種アミン)-金属錯体の蛍光寿命

アルデヒド成分をサリチルアルデヒド (Sal) に固定し, 各種アミンを変化させたときのシッフ塩基金属錯体の蛍光寿命を Table 1 に示した。Sal とグリシンのシッフ塩基の場合, シッフ塩基生成の平衡定数¹¹⁾が小さい

ため遊離のシッフ塩基はほとんど生成していない。従って, 試薬から試験液の値は Sal による蛍光に相当するものである。この Sal とグリシンから生成するアルミニウム錯体は過剰の試薬分子との蛍光寿命差が, 検討したシッフ塩基化合物の中で最も大きく 8.4 ns と観測された。

その他の場合では, 金属錯体の蛍光寿命が小さいか, 又は試薬自身のそれが大きいことため蛍光寿命に大きな違いが認められなかった。なお, 使用した蛍光寿命測定装置 (NAES-500) の蛍光寿命測定可能範囲は 0.1 ns~数 μ s であり, Table 1 の中で, 試薬から試験液の蛍光寿命が 0.1 ns 以下とは正確な値は求められなかったことを示す。

検討したシッフ塩基化合物の中で最も蛍光寿命差が大きい Sal とグリシンによる蛍光寿命差を利用したアルミニウムの定量下限の検討を以下に行った。

3.2 測定時間と蛍光カウント強度サンプリング範囲

本法での蛍光寿命 (蛍光減衰曲線) の測定は時間相関光電子計数法であるので, 蛍光強度 (カウント数) は測定時間に比例する。定量の際に十分な蛍光強度と再現性を得るためには, 測定時間が重要である。Fig. 1 にアルミニウム錯体の各蛍光カウント強度サンプリング範囲における測定時間と相対標準偏差 (RSD) ($n=8$) を示した。蛍光カウント強度積算範囲は 15 ns 以上 50 ns までの範囲ではほぼ同一の RSD であった。更に測定時間はいずれの場合も 200 s 以上で一定値を示した。サンプリング時間間隔を立ち上がり以降, 後半で短くとる (35 ns 以降) と強度が極端に小さくなり, 著しく感度が低減した。従って, 蛍光カウント強度サンプリング範囲は高感度が得られる 15~50 ns 又は 25~50 ns が適していた。測定積算時間は 300 s を選定した。

Table 1 Fluorescence lifetime of metal complexes with Schiff bases (Sal+amines) and reagent blanks

Metal	pH	Amine	τ /ns	
			Blank	Complex
Al	5.8	H ₂ NCH ₂ COOH	<0.1	8.4
Mg	11.6	H ₂ NCH ₂ COOH	<0.1	2.8
Zn	8.0	H ₂ NCH ₂ COOH	<0.1	2.1
Be	11.0	CH ₃ NH ₂	<0.1	3.7
	11.0	<i>i</i> Pr-amine	<0.1	3.0
Al	8.0	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂	<0.1	6.0
	6.2	H ₂ NNHCONH ₂	3.0	6.2
	5.8	<i>o</i> -aminophenol	4.2	4.9

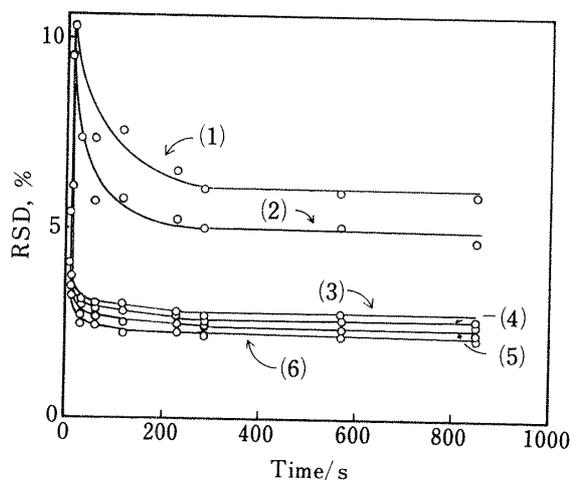


Fig. 1 Effect of measurement time on RSD

Sal: 0.04% 1 ml/25 ml (1.3×10^{-4} M); Glycine: 2.1×10^{-2} M; Al(III): 0.02 $\mu\text{g}/25$ ml (3.0×10^{-8} M); pH = 5.8, Ex/Em = 350 nm/435 nm; (1): 9~50 ns, (2): 12~50 ns, (3): 15~50 ns, (4): 40~50 ns, (5): 30~50 ns, (6): 25~50 ns

3.3 定量下限の検討

測定時間を一定 (300 s) としてアルミニウム濃度 2.1 $\mu\text{g}/25$ ml と 0.02 $\mu\text{g}/25$ ml (定量下限付近) のアルミニウム錯体溶液とから試験液の蛍光減衰曲線 (縦軸は式 (1) の $\log F$ に相当) を Fig. 2(a) に示した。曲線(1)は錯体の蛍光強度が十分強いため単一指数関数で表されており、蛍光寿命は 8.4 ns と計算された。アルミニウム濃度を 100 分の 1 にすると蛍光強度が著しく小さくなり (曲線(2)), から試験液による蛍光の影響を受けるため、錯体溶液の蛍光過渡波形は長寿命成分 (錯体) と短寿命成分 (から試験液) 曲線(3)が混ざりあった波形となった。Fig. 2(b) は錯体とから試験液の蛍光寿命がほぼ同一の Sal と *o*-アミノフェノールによるシッフ塩基を用いたときの蛍光減衰曲線を示したものである。

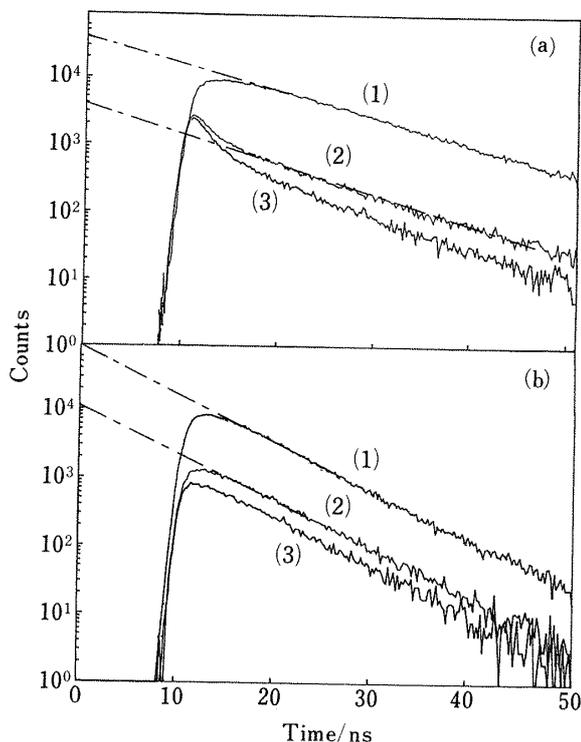


Fig. 2 Fluorescence decay curves of aluminium complexes with (a) Sal+glycine and (b) Sal+*o*-aminophenol

(a) Sal: 0.04% 1 ml/25 ml (1.3×10^{-4} M), glycine: 2.1×10^{-2} M, pH=5.8, Ex/Em=350 nm/435 nm; (b) Sal: 0.04% 1 ml/25 ml (1.3×10^{-4} M), *o*-aminophenol: 0.04% 1 ml/25 ml (1.5×10^{-4} M) pH=5.8, Ex/Em=405 nm/520 nm; Measurement time: 300 s, (1) Al(III): 2.0 $\mu\text{g}/25$ ml (3.0×10^{-6} M), (2) Al(III): 0.02 $\mu\text{g}/25$ ml (3.0×10^{-8} M), (3) reagent blank

アルミニウム濃度 0.02 $\mu\text{g}/25$ ml の錯体溶液とから試験液の各サンプリング時間間隔での蛍光総カウント数と定常光強度の比較を Table 2 に示した。定常光での錯体とから試験液蛍光強度比及び蛍光過渡波形の錯体と

Table 2 Complex to blank ratio by fluorescence decay curve

	Counts ^{a)}				F. I. ^{b)} (stationary light)
	7~50 ns	15~50 ns	25~50 ns	35~50 ns	
Complex (Net)	26144	23732	19064	7480	11.7
Blank	60655	42126	23668	6584	24.2
Net/Blank	0.431	0.563	0.805	1.14	0.485

Aluminium (III): 0.02 $\mu\text{g}/25$ ml (3.0×10^{-8} M); Sal: 0.04% 1 ml/25 ml (1.3×10^{-4} M); Glycine: 2.1×10^{-2} M, Ex/Em=350 nm/435 nm. a) NAES-500 (measurement time: 300 s); b) Shimadzu RF-540 (fluorescence intensity)

Table 3 Limit of aluminium(III) determination

	Limit of determination	RSD
Conventional method	0.02 µg/25 ml	4.1%
Present method†	0.02 µg/25 ml	2.1%
	0.005 µg/25 ml	4.0%

Sal: 0.04% 1 ml/25 ml (1.3×10^{-4} M); Glycine: 2.1×10^{-2} M; Ex/Em: 350 nm/435 nm. † Measurement time: 300 s; Sampling time span: 25~50 ns

ら試験液の総カウント強度 (7~50 ns) 比はほぼ同程度を示した。蛍光過渡波形において 25 ns 以上での錯体とから試験液の蛍光強度比は約 1.7 倍以上改善され、から試験液の影響を小さく抑えることが可能となった。

Table 2 はサンプリング範囲を立ち上がり以降、後半で短くとればとるほどから試験液の影響が低減できることを示している。しかし感度は著しく小さくなるために、定量には 25~50 ns の範囲での蛍光カウント強度を用いた。そのような条件で作成した検量線は従来の蛍光測定と同じように、十分な直線性を示した。Table 3 に本法と従来法のアルミニウムの定量下限を示した。従来の蛍光光度計を用いた方法による定量下限は 0.02 µg/25 ml (8 回測定による相対標準偏差は 4.1%) であった。蛍光寿命差を利用したこの方法では同濃度では相対標準偏差 (8 回測定) は 2.1% で十分な精度が得られ、更にアルミニウム濃度 0.005 µg/25 ml まで精度良く (8 回測定による相対標準偏差は 4.0%: ただし 25~50 ns における積算強度を用いた) 定量できることが分かった。従来の蛍光測定装置 (RF-540) を用いた蛍光強度測定と比較して、定量下限濃度を約 1/4 倍程度に下げることが可能となった。

3.4 蛍光減衰曲線の切片カウント強度を利用する定量法

一定積算時間で蛍光減衰曲線において切片 (Fig. 2 に

おいてサンプリング時間 0 のとき外挿値) の蛍光カウント強度は錯体の濃度に比例する。この方法では錯体と試薬から試験液の蛍光寿命に差が見られない場合にかぎり有効であった。実際に蛍光寿命差がほとんど見られない (Table 1) Sal+o-アミノフェノールによるアルミニウムの定量では従来法と同程度の定量範囲で定量が可能であった。しかし蛍光寿命差が大きい先述の系では、アルミニウム濃度が 1.0 µg/25 ml 以下ではから試験液 (短寿命成分) の影響が顕著になり、単一指数関数で表せなくなった。よって正確な平行直線が引けなくなるため検量線が湾曲し、定量下限は従来法より約 10 倍高い 0.2 µg/25 ml が限界であった。

これまでの検討結果から、本法は、蛍光寿命差を利用して新たな微量分析法としての可能性を示すものと考えられる。本法は金属錯体と試薬から試験液に著しい蛍光寿命差がある場合に有効であることが分かった。今後の試薬の探索により微量分析において更なる発展が期待できる方法である。

文 献

- 1) F. E. Lytle, D. R. Storey, M. E. Jurich: *Spectrochim. Acta*, **29A**, 1357 (1973).
- 2) 西川泰治, 平木敬三, 森重清利: *分析化学*, **25**, 459 (1976).
- 3) K. Hiraki, K. Morishige, Y. Nishikawa: *Anal. Chim. Acta*, **97**, 121 (1978).
- 4) 渡辺邦洋, 青木伊豆男: *分析化学*, **35**, 487 (1985).
- 5) 渡辺邦洋, 青木伊豆男: *分析化学*, **35**, 795 (1986).
- 6) 渡辺邦洋, 青木伊豆男: *分析化学*, **35**, 1 (1986).
- 7) 渡辺邦洋, 青木伊豆男: *分析化学*, **34**, 497 (1985).
- 8) K. Morishige: *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **40**, 843 (1978).
- 9) E. P. Diamandis, T. K. Christopulos: *Anal. Chem.*, **62**, 1149A (1990).
- 10) D. C. Freeman, Jr., C. E. White: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2678 (1956).
- 11) B. E. Leach, D. L. Leussing: *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 3377 (1970).



Time-resolved fluorescence determination of aluminium with Schiff base obtained from salicylaldehyde and glycine. Kunihiro WATANABE and Satoshi MORIKAMI (Faculty of Science and Technology, Science University of Tokyo, 2641, Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278)

A time-resolved fluorescence method based on the lifetime difference between a metal complex and its reagent has been investigated for the determination of trace amounts of aluminium. The fluorescence lifetimes of several metal-Schiff base complexes were de-

terminated to find the long lifetime complexes. The lifetime of aluminium-salicylaldehyde-glycine complex was the longest of the complexes examined. The lifetime difference between the complex and its reagent was 8.4 ns. The optimum photon counting time was examined in order to eliminate short-lived fluorescence by excess reagent. As a result, sampling time over the range of 25~50 ns decreased the reagent blank value, hence decreasing the limit concentration of aluminium determination down to 5 ng/25 ml. The determination conditions were as follows: salicylaldehyde, 1.3×10^{-4} M; glycine, 2.1×10^{-2} M; pH 5.8; Ex/Em, 350 nm/435 nm; measurement time, 300 s. The limit of determination in the present method was superior to the conventional one because of the lower reagent blank value.

(Received March 22, 1993)

Keyword phrases

determination of aluminium; fluorescence lifetime; Schiff base; time-resolved fluorescence determination; trace analysis.
