

報 文

1,8-ジアミノナフタレン-3,6-ジスルホン酸骨格を持つ新規水溶性
蛍光試薬の合成と銅イオンの高感度定量への応用

野村 一央*, 大島 光子*, 高柳 俊夫*, 本水 昌二*

Highly sensitive determination of copper ion with newly synthesized water-soluble fluorescent reagents having a 1,8-diaminonaphthalene-3,6-disulfonic acid skeleton

Kazuhiro NOMURA, Mitsuko OSHIMA, Toshio TAKAYANAGI and Shoji MOTOMIZU*

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-naka, Okayama 700-8530

(Received 2 May 2002, Accepted 29 July 2002)

Water-soluble fluorescent reagents, 1,8-di-(toluene-4-sulfonylamino)-naphthalene-3,6-disulfonic acid (BTND) and 1,8-di-(trifluoromethanesulfonylamino)-naphthalene-3,6-disulfonic acid (BTFND), were newly synthesized. The reactivities of these fluorescent reagents to Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , V^{5+} , Ag^{+} , Fe^{3+} , and Mg^{2+} were examined. BTFND was reacted with 8 metal ions, except for Pb^{2+} , to show fluorescence quenching. BTND was selective to Cu^{2+} , and the fluorescence was quenched quantitatively at pH 7 in an aqueous solution ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 405$ nm). The calibration graph for Cu^{2+} with BTND was rectilinear over the concentration range from 0 to 10^{-5} M and the detection limit was 2.0×10^{-7} M. BTND has many advantages, such as selectivity for Cu^{2+} , high sensitivity, and a simple procedure.

Keywords : determination of copper ion; 1,8-di-(toluene-4-sulfonylamino)-naphthalene-3,6-disulfonic acid; 1,8-di-(trifluoromethane-4-sulfonylamino)-naphthalene-3,6-disulfonic acid; fluorescence detection.

1 緒 言

各種排水や河川水、海水、土壌中などに含まれる重金属類は環境汚染の原因の一つであり、人体への毒性が考えられることからその挙動が注目されている。また、存在量が極微量であること多く、定量するためには濃縮や共存元素からの分離が必要である。これら重金属類の定量には吸光光度法や蛍光光度法、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS), ICP 発光分析法 (ICP-AES), 原子吸光法 (AAS) 等が利用してきた。しかし、ICP-MS, ICP-AES, AAS 等は、感度は比較的良いが装置が高価などの欠点が挙げられる。また、吸光光度法を用いた銅(II)イオンの定量にはジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムを用いた定量法¹⁾などがあるが、定量下限は 5.0×10^{-5} M 程度で蛍光

光度法に比べて感度が低い。本研究では、より高感度な蛍光光度法による金属イオン定量を目的とし、前処理を必要とせず、操作が簡便で高感度・高選択的かつ、水溶液一相系での定量が可能な新規蛍光誘導体化試薬の開発を行った。蛍光光度法による銅(II)イオン定量法としては、5-(3-フルオロ-4-クロロフェニルアゾ)-8-アミノキノリン²⁾, ルシフェルイエロー CH³⁾を用いる報告がある。前者では、感度は良いが前処理による Fe^{3+} の除去を必要とすることや、常温では錯形成しにくいなどの欠点が挙げられる。そこでクロモトロープ酸^{4,5)}が水溶液内でホウ素と錯形成し蛍光測定により定量できることに着目し、金属イオンと錯形成させるために、ヒドロキシル基の代わりにアミノ基を導入した、水溶性検出試薬 1,8-ジアミノナフタレン-3,6-ジスルホン酸 (DANDS) 及び 1,8-ジ-(トルエン-4-スルホニルアミノ)-ナフタレン-3,6-ジスルホン酸 (BTND) 及び 1,8-ジ-(トリフルオロメタンスルホニルアミノ)-ナフタレン-

* 岡山大学理学部化学科: 700-8530 岡山県岡山市津島中3-1-1

3,6-ジスルホン酸 (BTFND) を合成した。このうち、BTND は銅(II) イオンと特異的に反応することが分かったので、蛍光光度法による銅(II) イオンの定量法を開発した。

2 試薬及び装置

2・1 試薬

銅標準溶液：硫酸銅五水和物（和光純薬製、試薬特級）を水に溶かして 1.0×10^{-3} M の原液とし、これを適宜水で希釈して使用した。

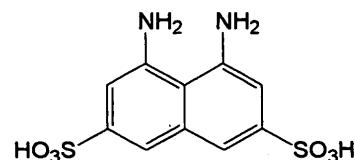
リン酸緩衝液：0.5 M リン酸二水素カリウム水溶液と 0.5 M リン酸水素二ナトリウム水溶液を混合したものを原液とし、これを適宜水で希釈して使用した。

合成用を除くその他の試薬はすべて試薬特級品を使用した。

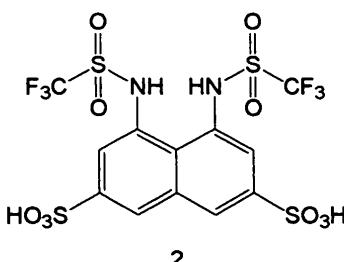
2・2 蛍光試薬の合成

まず DANDS を文献に従って合成した^{6,7)}。95% 硫酸 49 g に 2,7-ナフタレンジスルホン酸 9.6 g を溶かし、この溶液を 0~3°C まで冷却し、この温度に保ったまま発煙硝酸 2.5 g を採り、1 時間かけて滴下し、その後 1 時間同温度でかくはんした。更に発煙硝酸 2.5 g を同様に滴下し、3 時間同温度でかくはんした。その後、水 45 g と混合し、硫酸濃度を約 50% にした。その溶液を 90~95°C に加温し、2 時間保温かくはんした。これに 48% 水酸化ナトリウム水溶液 6.4 g を加え、1,8-ジニトロナフタレン-3,6-ジスルホン酸二ナトリウム塩の結晶を得た。水 10 ml に塩化アンモニウム 0.21 g、鉄粉 3.8 g を加え、98~100°C に昇温し、30 分間保温かくはんした。これに同温度で 1 時間かけて 1,8-ジニトロナフタレン-3,6-ジスルホン酸 4.2 g を加え、更に同温度で 1 時間かくはんした。70°C まで冷却後、沪過により鉄粉を除去した。沪液に 17.8% 硫酸 10 ml を加え、DANDS (二ナトリウム塩) 3.4 g を得た。

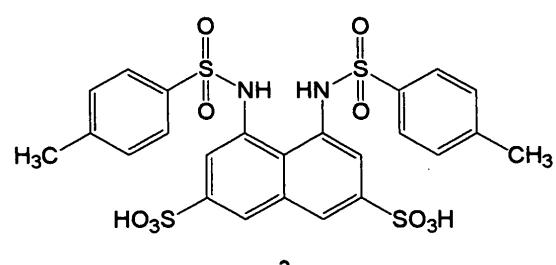
DANDS 0.34 g をピリジン 15 ml に溶かし、かくはんしながら *p*-トルエンスルホニルクロリド 0.67 g を加え、60°C まで加温した。これを 55°C で 8 時間かくはんし、室温で 16 時間放置した。その後ロータリーエバポレーターを用いて油状になるまで溶媒を除去した。10% 水酸化ナトリウム 10 ml を加え、更に 3 ml の水を加えた。得られた溶液を 10 ml のジエチルエーテルと振り混ぜ、不純物を抽出除去した。この抽出操作を 5 回行った後、ロータリーエバポレーター並びに真空乾燥器を用いて乾固し、BTND の結晶を得た。本合成法は文献を参照して行った^{8)~12)}。また、BTFND は DANDS 0.34 g にトリフルオロメタンスルホニルクロリド 0.7 ml を加え、ほぼ同様の操作を行うことによって結晶を得た。これら今回合成した化合物については ^1H NMR で同定した。重水を用いた ^1H



1



2



3

Fig. 1 The structures of the reagents examined

1: DANDS; 2: BTFND; 3: BTND

NMR の測定には標準試料として 2,2-ジメチル-2-シラペント-5-スルホン酸塩を加えた。BTND と BTFND の ^1H NMR データを下に示す。BTND: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2.27 (s, 6H), 7.02 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.10 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.72 (d, J = 8.0 Hz, 2H)。BTFND: ^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 8.44 (s, 4H)。BTFND についてシグナルが一つしか得られなかったのは、ナフタレン環 2 位のプロトンのシグナルが低磁場へシフトし、4 位のものと重なったためと考えられる。また合成したこれらの試薬について融点を測定したところ、BTND は 300°C 以上であった。BTFND については潮解性があるため測定できなかった。これら 3 種の試薬の構造式を Fig. 1 に示す。

2・3 装置

吸光度の測定には島津製 UV-2400PC 型分光光度計、蛍光強度の測定には日立製 650-10S 型分光蛍光光度計を使用した。

3 実験及び結果

3・1 酸解離定数の測定

合成した 3 種の試薬の酸解離定数 (pK_a) を紫外吸収を利用して求めた。BTND 及び BTFND を 1.0×10^{-4} M,

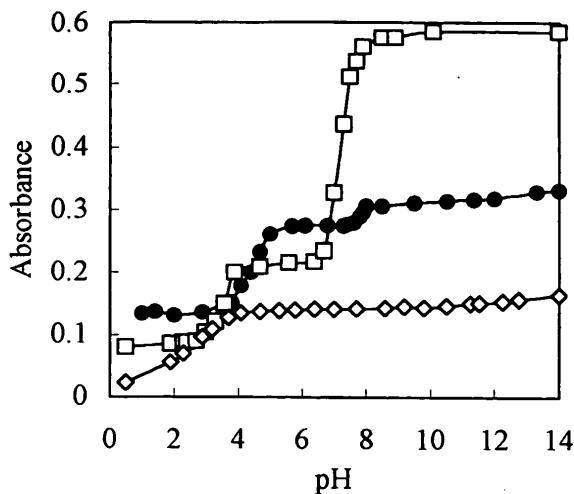


Fig. 2 Relationship between absorbance and pH to the synthesized reagents

□ BTFND: 2.0×10^{-4} M; $\lambda_{\text{max}} = 360$ nm;
 ● BTND: 2.0×10^{-4} M; $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm;
 ◇ DANDS: 2.0×10^{-5} M; $\mu = 0.1$ M

Table 1 Acid dissociation constants, absorption maxima and fluorescence wavelengths of the synthesized reagents

	λ/nm	$\text{p}K_{\text{a}1}$	$\text{p}K_{\text{a}2}$	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$
DANDS	360	2.88	—	360	432
BTFND	360	3.50	7.02	400	458
BTND	350	4.77	7.62	365	436

$\mu = 0.1$ M

DANDS を 1.0×10^{-3} M となるように水に溶かして貯蔵液とした。使用の際は 10 倍に希釈して用いた。それぞれの試薬溶液にモノクロロ酢酸、酢酸、リン酸、アンモニア緩衝液を加えて pH 0.5~14 に調整した。なお、pH 0.5 と 14 の溶液は塩酸と水酸化ナトリウムを用いて調整し、イオン強度 (μ) は硫酸ナトリウムを用いて 0.1 M に調整した。BTND は 350 nm, BTFND 及び DANDS は 360 nm で吸光度を測定した。得られた pH と吸光度の関係を Fig. 2 に示す。また、これから算出した各試薬の $\text{p}K_{\text{a}}$ を Table 1 に示す。

各試薬とも $\text{p}K_{\text{a}1}$, $\text{p}K_{\text{a}2}$ はアミノ基のプロトンの解離に相当すると考えられる。なお、DANDS については、測定した pH 範囲では明確な吸光度の変化が見られず、 $\text{p}K_{\text{a}2}$ は得られなかった。

3・2 キレート生成に及ぼす pH の影響

各合成試薬は蛍光を発するので金属イオンの高感度定量のために利用することとし、励起波長並びに蛍光波長を求めた。結果を Table 1 に示す。

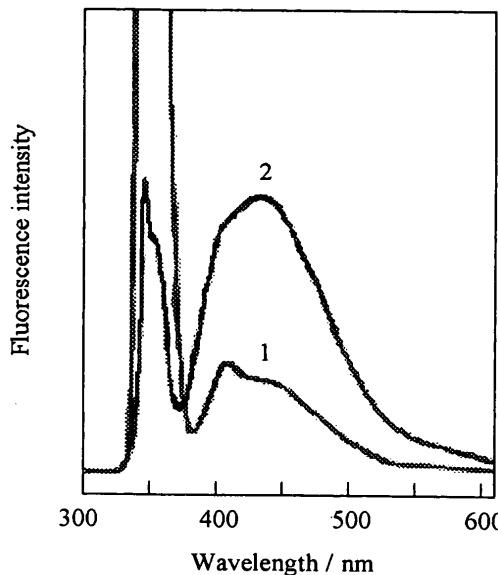


Fig. 3 Excitation and emission spectra of BTND and its Cu(II)-complex

Shorter wavelengths than 370 nm are for the excitation and longer wavelengths are for the emission spectra.

- 1: BTND-Cu(II), $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 405$ nm;
 2: BTND, $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 432$ nm

まず金属イオンとの反応の pH の最適化を行った。各試薬についてそれぞれの $\text{p}K_{\text{a}1}$ 値以上の pH において Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , V^{4+} , Ag^{+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} の 9 種の金属溶液添加時の蛍光強度を測定・比較し、最適な pH の選定を行った。その結果、いずれの試薬においても pH 6.7 のリン酸緩衝液を用いたとき、試薬空試験値に対し最も大きい蛍光強度差が得られたので、詳細な反応性の検討は pH 6.7 で行った。また、いずれの金属イオンとも錯体生成に伴い消蛍光を示すことが分かった。BTND について、試薬と Cu^{2+} 錯体のスペクトルを Fig. 3 に示す。

3・3 合成試薬と金属イオンとの反応性

各試薬水溶液 2.0×10^{-3} M 2.5 ml に 0.16 M のリン酸緩衝液 (pH 6.7) 2.5 ml を加え、試薬と同濃度の 9 種の金属イオン溶液を 2.5 ml 加え、蒸留水で 25 ml にして最適波長と蛍光強度を測定した。結果を Table 2 に示す。

DANDS 及び BTND では、検討した金属イオンの中で銅 (II) イオンとのみ選択的に反応することが分かった。また、BTFND では鉛以外の 8 種の金属イオンと反応した。これらの結果より、いずれの試薬も銅 (II) イオンとよく反応しており、検討した遷移金属イオン間では感度は Irving-Williams 系列に従っていることから、銅 (II) 錯体が最も安定なキレートを形成するものと思われる。また、BTND が特に銅 (II) に特異的であることが分かった。以後の定量に関する検討では、特異的で高感度であった銅

Table 2 Differences in fluorescence intensities (ΔFI) between various metal complexes and the synthesized reagents

	DANDS		BTFND		BTND	
	λ_{em}/nm	ΔFI	λ_{em}/nm	ΔFI	λ_{em}/nm	ΔFI
Blank	436	0	458	0	432	0
Cu^{2+}	436	1.70	458	2.81	405	1.92
Ni^{2+}	436	0.16	458	3.01	432	0.05
Co^{2+}	436	0.17	458	1.73	432	0.06
Cd^{2+}	436	0.17	458	1.12	432	-0.04
Pb^{2+}	436	0.19	458	—	432	0.19
V(V)	436	0.17	458	1.32	432	0
Ag^+	436	0.38	458	1.90	432	0.14
Fe^{3+}	436	0.16	458	1.76	432	0.07
Mg^{2+}	436	0.39	458	1.92	432	0.06

Metal ions: $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$; pH = 6.7; DANDS: $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$; λ_{ex} : 365 nm; BTFND: $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$; λ_{ex} : 400 nm; BTND: $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$; λ_{ex} : 360 nm

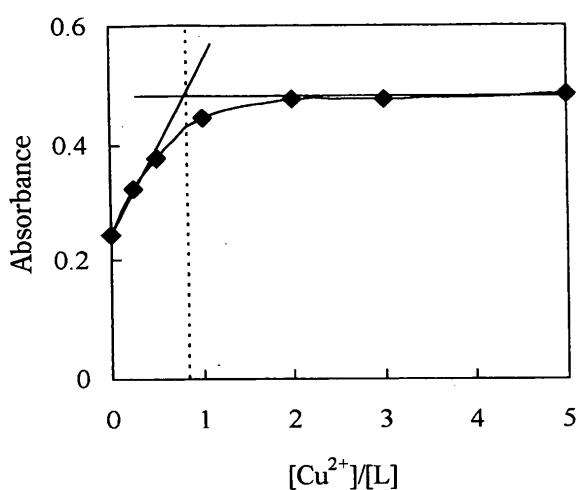


Fig. 4 Molar ratio method of Cu^{2+} to BTND by absorbance measurement

BTND: $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\lambda = 340 \text{ nm}$; pH = 6.7

(II) イオンについて行うこととした。

3・4 銅(II) 錯体の組成比

銅(II) イオンと各試薬との錯体の組成比を吸光度測定によりモル比法で検討した。試薬濃度を一定とし、銅(II) イオン溶液の濃度を変化させ、BTND は 340 nm, BTFND 及び DANDS は 350 nm で吸光度を測定した。BTND について得られた結果を Fig. 4 に示す。ほかの二つの試薬も銅(II) イオンとは 1:1 で反応していることが分かった。

3・5 銅(II) イオン定量のための検量線

各試薬を用いて蛍光光度法により銅(II) イオンの検量線を作成した。DANDS, BTFND 及び BTND については、銅(II) イオン濃度 $0 \sim 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ の範囲でそれぞれ $y = 0.50x + 0.14$, $y = 2.29x - 0.012$ 及び $y = 1.23x + 0.20$, 相関係数 0.994, 0.998 及び 0.998 の良好な直線関係が得ら

Table 3 Tolerance limits of the foreign ions in the determination of Cu^{II} with BTND

Ion	Tolerable conc.*/ 10^{-7} M
Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , V^{V}	5000
Fe^{3+}	500
Ag^+	300
Co^{2+}	100
Ni^{2+}	50

* Tolerable concentration: the errors are within $\pm 5\%$.
 Cu^{2+} : $5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$; BTND: $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$; metal ions: $5.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$; pH = 6.7

れた。DANDS と BTFND を用いた場合の銅(II) イオンの検出下限はいずれも $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, BTND については、より低濃度である $2.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ であった。

3・6 共存イオンの影響

銅(II) イオンに対して最も特異的かつ選択的に反応性を示した BTND を用いて、 $5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ の銅(II) イオンの存在下で共存イオンの影響について検討した。検討には Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , V^{V} , Ag^+ , Fe^{3+} , Mg^{2+} の 8 種類の金属を用いた。結果を Table 3 に示す。許容限界は定量において $\pm 5\%$ の誤差を与える共存イオンの濃度で示した。影響の大きい金属は Ni^{2+} 及び Co^{2+} で、許容限界はそれぞれ $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ であった。

本研究で金属イオン定量への応用のために合成した蛍光試薬 BTND は、(1) 高感度・高選択的な銅の定量が可能であること、(2) 水溶液一相系での定量が可能であること、(3) 操作が簡便であることなどの利点を持ち、FIA などに応用することにより更に高感度化が期待できる。

文 献

- 1) H. Onishi: "Photometric Determination of Traces of

- Metals*", p. 506 (1985), (Wiley Interscience, New York).
- 2) Q.-E. Cao, K. Wang, Z. Hu, Q. Xu: *Talanta*, **47**, 921 (1998).
 - 3) T. Mayer, D. Wencel, T. Werner: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **371**, 44 (2001).
 - 4) D. F. Kuemmel, M. G. Mellon: *Anal. Chem.*, **29**, 378 (1957).
 - 5) G. Martin, M. Maes: *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **34**, 1178 (1952).
 - 6) 藤井宏紀, 泉 幸男, 柴本信頼: 日本特許公開公報, 59 51253 (1984).
 - 7) 藤井宏紀, 泉 幸男, 柴本信頼: 日本特許公開公報, 4 210954 (1992).
 - 8) R. W. Alder, M. R. Bryce, N. C. Goode: *J. Chem. Soc., Perkin Transc.*, **1981**, 2840.
 - 9) J. L. Parsons, P. A. Risboid, W. A. Barbera, M. N. Sharma: *J. Heterocyclic Chem.*, **25**, 911 (1988).
 - 10) H. Takahashi, T. Kawakita, M. Ohno: *Tetrahedron*, **48**, 5691 (1992).
 - 11) S. Ide, M. Takagi: *Anal. Sci.*, **5**, 351 (1989).
 - 12) M. Takagi, T. Omori, S. Matsuo, K. Ueno, S. Ide: *Chem. Lett.*, **1980**, 387.

要 旨

水溶性蛍光試薬として 1,8-ジヒドロキシナフタレン-3,6-ジスルホン酸 (クロモトロープ酸) に類似した 1,8-ジアミノナフタレン-3,6-ジスルホン酸骨格を持つ 1,8-ジ-(トルエン-4-スルホニルアミノ)-ナフタレン-3,6-ジスルホン酸 (BTND) 及び 1,8-ジ-(トリフルオロメタンスルホニルアミノ)-ナフタレン-3,6-ジスルホン酸 (BTFND) を合成し, 金属イオンとの反応性を検討した. BTFND は検討した 8 種類の金属イオンと反応し 消蛍光を示した. また BTND は銅(II) イオンと選択的に反応することが分かった. BTND は水溶液中 pH 7 で銅(II) イオンと定量的に反応し, 消蛍光を示したので, 検量線を作成したところ, 銅濃度 $0 \sim 10^{-6}$ M の範囲で直線関係を示した ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$). 本法の銅(II) イオンの検出下限は 2.0×10^{-7} M であった. BTND は水溶液中で反応し, 定量操作が簡便で, 銅(II) イオンに対する高感度・高選択的な 蛍光試薬であることが分かった.