

フルオレセインはどのような条件でよく光るのか

平岡 諒也 大島 拓朗

要約

蛍光物質のフルオレセインを用いて、最も強く蛍光を発する条件を調査した。条件としては、pHを4, 7, 10, 13と変化させ、測定を行った。蛍光光度計が学校にないため、実験では自作の装置を作成した。自作装置では、はんだ付けの不具合から、接触不良が起り液晶が映らなかった。そこで、自作の照度計を蛍光光度計として吸光光度計に取り付けた装置を使用し、テスターで電圧を測定して、その結果をグラフにまとめた。フルオレセインは無水フタル酸とレゾルシン、触媒として塩化亜鉛を混ぜて加熱することで得られた。未反応のものはろ過をすることによって取り除いた。赤色の粘土状、無臭のものができ、水に溶かすと黄緑色の蛍光がみられた。フルオレセイン溶液は、pH4, 7, 10, 13の各溶液にフルオレセインを溶かし、溶けきれなかったものは、不純物としてろ過により取り除いた。結果、pH4からpH13になるにつれて黄緑色の蛍光が強くなっているようにみられた。pH13のとき以外では、吸光度と蛍光度の相互作用によって見られる反応がなかった。既存の報告では、吸光度490 nm、蛍光度521 nmのときに特有のピークが見られ、このとき最も発光する波長は、490 nm~521 nmの時とされている。しかし本研究では、吸光度490 nmのときに特有のピークが見られたが、蛍光度では500 nmのときに特有のピークが見られた。以上の結果から、最適発光条件は波長が490 nm~500 nmのときだと考察できる。

1. 序論

2008年に下村脩さんが「オワンクラゲの緑色蛍光タンパク質の発見」に関する研究で、ノーベル化学賞を取ったことを知り、蛍光物質に興味を持った。調べてみると、蛍光物質を着色することによって、癌細胞などが転移した場所を確認できるという研究が進んでいたり、一方身近な所でも、蛍光物質は蛍光ペンとして、私たちの生活に欠かせないものになっている。そして今、蛍光の分野がとても注目がされていることを知った。そこで私たちは化学ゼミで蛍光について探究することにした。

蛍光物質のフルオレセインに注目した理由としては、簡単に合成できることと、フルオレセインの蛍光色が黄緑色と、私たちにとって身近なものだったからである。

はじめに私たちは、フルオレセインを合成したが、その際、pHにより、溶液の色や蛍光の強さが変化することに気付いた。そこで、フルオレセインの発光強度に関してpHの最適条件を調査するために実験を行った。pHを変えることで、蛍光の強さが変化するならば、最も強く光る条件を見つけることにより、様々な応用製品での機能向上が期待できると考えた。蛍光度を測定するための蛍光光度計が学校にはなかったため、自作の装置を作成

した。学校にあった吸光光度計に自作照度計を蛍光光度計として取り付け、蛍光度は電圧値としてmVでしめた。

<フルオレセイン>

A.Baeyerが発明した酸性染料でおもに不安定な黄色と、安定している赤色のものがある。用途としては、色素レーザーの媒体、法医学や血清学における血痕の探索、色素追跡用途などに広く利用されている。

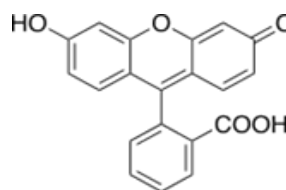
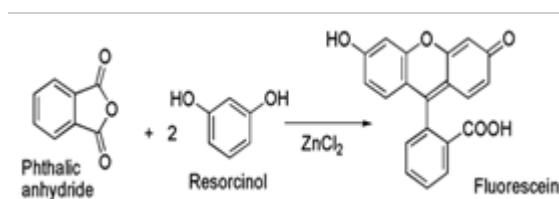


図1 フルオレセインの構造式



無水フタル酸+レゾルシン → フルオレセイン

図2 フルオレセインの反応式

<吸光度>

分光法において、ある物体を光が通った際に強度がどの程度弱まるかを示す無次元量である。光学密度とも呼ばれることがある。吸収・散乱・反射をすべて含むため、吸収のみを表すものではない。

<蛍光光度計>

分子に光を照射すると、光を吸収したのちそのエネルギーを光として放出することがある。これを蛍光とよび、この光のスペクトルと強度を測定することにより、試料の性質と濃度を調べることができる。これを蛍光分析法と呼び、それを利用して蛍光度を測るものが蛍光光度計である。



図3 フルオレセイン溶液 (右から pH 4, 7, 10, 13)

2. 研究内容

実験1 デジタル照度計の作成

<目的>

蛍光の強度を測定するためフォトダイオードを用いたデジタル照度計を作成する。自作の照度計を蛍光光度計として取り付け、蛍光度は電圧値として表示することにした。

<使用器具>

器具：照度計キット LX メータ・セット

秋月電子通商 (有)

(キットの中：基盤 液晶 フォトダイオード 金属皮膜抵抗 乾電池) はんだ はんだごて 銅線

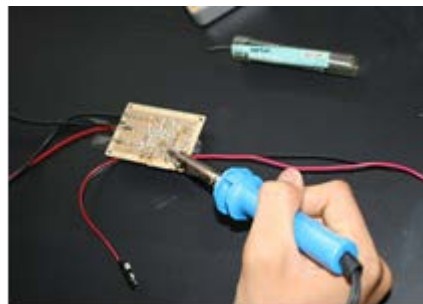


図4.反応装置

<結果>

はんだづけをすることによって基盤に付けることができた。しかし、液晶との接触が悪く映らなかったのでテスター (mV) を使うことで代用した。使用するには、吸光光度計と自作照度計を接合して使用するため、銅線を使いフォトダイオードを基盤からはなした。

実験2 フルオレセインの合成

<実験方法>

無水フタル酸 (M=148) を 0.74 g とレゾルシン(レゾルシノール M=110)を 1.1 g と、触媒として塩化亜鉛を使うことによって効率的に反応をさせようとした。加熱をするときには、砂を入れた皿をいれることによって温度の急上昇・低下を防ぐ。使用時に、反応をしていないものや、不純物を取り除くためにろ過を行う。

<使用器具・薬品>

無水フタル酸 レゾルシン 塩化亜鉛 水酸化ナトリウム 塩酸 薬さじ 三脚 ガスバーナー 時計皿 ろうと ろ紙 ガラス棒 精製水

<結果>

赤色の粘土状で、無臭であるものが出来た。水に溶かすと黄緑色の溶液ができた。よって、これは濃度が高いために色が本来のもの(水溶液内で見られたもの)とは違うようにみえることがわかった。時間が経過すると、液状になり始めたことから、潮解性(空気中の水と反応して液状になる現象)を持つのではないかと予測した。



図5 フルオレセイン溶液

実験3 フルオレセイン溶液の作製

<作成方法>

HClとNaOHを用いて、pH 4, 7, 10, 13の水溶液を調査した。pHの調査にはpHメーターを用いた。実験2で合成したフルオレセインを0.1gずつ溶かし各水溶液にて、50mLとした。溶液に溶けずに沈殿したものを、ろ過をして取り除く。

<使用器具・薬品>

フルオレセイン 塩酸 水酸化ナトリウム 精製水 ビーカー (100 mL) ろうと ろ紙 ガラス棒 薬さじ ペトリ皿 砂

<生成物>

フルオレセインをpH4, 7, 10, 13に溶かしたものは黄緑色の蛍光がみられた。pHが4から13になるにつれて、微弱だが黄緑色の蛍光が強くなっているようにみられた。ブランクとしての吸光度、蛍光度の値は溶液どうしには、違ったところはみることができなかった。ろ過をした後で、ろ紙に残ったものは精製水に溶かすと黄緑色の溶液となり、これはフルオレセインが完全に溶けずに沈殿したものだと考えられた。再び溶かした溶液の中にも沈殿するものが含まれていたが、この物質はフルオレセイン以外の不純物であることが分かった。



図6 ろ紙に残った不純物

実験4 吸光度と蛍光度の測定

<使用器具・薬品>

実験1で作成した照度計 吸光度計 テスター
フルオレセイン (pH 4, 7, 10, 13) 溶液
ブランク (pH 4, 7, 10, 13)

<実験方法>

実験3で調製したフルオレセイン溶液の吸光度と蛍光度を測定する。測定装置は吸光度計に実験1で作成した蛍光度計を組み合わせたもの(以後 自作装置とする)を用いて測定をする。測定手順は以下の通りを行う。

- ① pH 4のフルオレセイン溶液とpH 4の水溶液をセルに入れる。
- ② 自作装置にまずpH 4のセルを入れ、ブランクとして測定する。
※蛍光度は測定する。(テスターの電圧値)
- ③ フルオレセインを溶かした溶液についてを測定する。このとき、吸光度と蛍光度を測定する。(吸光度は吸光度計、蛍光度は自作装置によって計測される。)
- ④ 波長を変えて②、③の作業を行う。
- ⑤ pH 7, 10, 13に変えて①~④の手順で測定を行う。

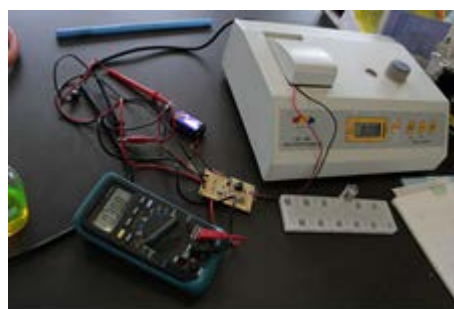


図7 自作装置

<結果>

pH 13 の場合以外では、吸光度と蛍光度の相互作用による変化は見る事ができなかった。pH=13 の吸光度の場合、波長 490 nm のときに最もよく変化が現れた。490 nm~510 nm のときは緑色を最も吸収する波長であり、このとき補色の赤色、黄緑色が観察された。蛍光度ではピークである 521 nm のときには特有の反応が見ることができなかった。

	吸光度	蛍光	蛍光度
400	1.490	39.0	0.7
430	1.874	38.9	0.6
460	1.790	38.8	0.5
470	1.784	38.8	0.5
480	1.319	38.8	0.5
490	1.356	38.7	0.4
500	1.878	38.4	0.1
510	1.685	38.8	0.5
520	1.022	38.8	0.5
530	0.238	38.8	0.5
540	0.086	38.7	0.4
570	0.030	38.7	0.4
600	0.003	38.8	0.5
	ブランク	38.3	

表1 pH13 の表

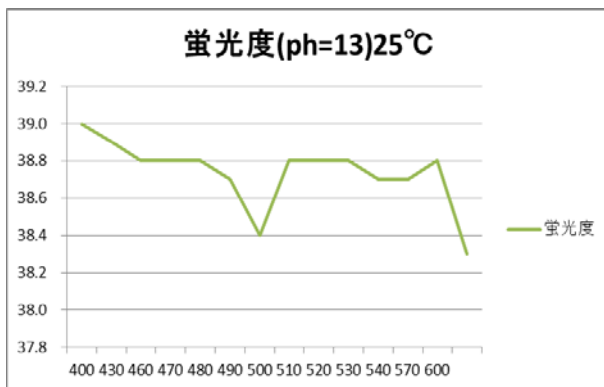


図8 pH13 の蛍光度

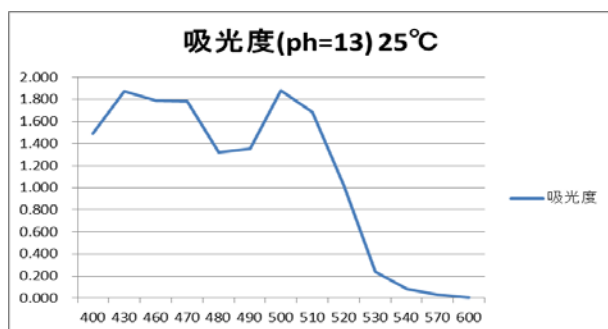


図9 pH13 の吸光度

<考察>

変化を観察できなかったのに対していくつかの原因をあげる。

- ① 液に当てる波長が強かったこと
- ② 溶液の濃度が高かったこと
- ③ 自作装置の値の正常かということが、調べられなかったこと
- ④ 自作装置の接触不良
- ⑤ 気候条件による変化

3. 結論

吸光度、蛍光度の特徴的なピークは pH13 のときのみ見られた。pH13 の場合でも、蛍光特有の変化は見られなかったが、吸光による反応は観察することができた。よって、490 nm のときに最大変化が起こった吸光度と、500 nm のときに変化が起こった蛍光度から最も発光するのは、波長が 490 nm~500 nm のときだと考察できる。

4. 課題

以下の点を改善する必要があると考える。

- ① 液に当てる波長が強かったこと
- ② 溶液の濃度が高かったこと
- ③ 自作装置の値の正常かどうかを確認する
- ④ 自作装置の接触不良・原因と改善
- ⑤ 日による変化

5. 謝辞

蛍光という素晴らしい分野を教えてくれた、化学ゼミの先生方、ありがとうございました。また、装置作成にあたりはんだづけの指導をして下さった先生・TA の先生・教育実習生の先生、たくさんの方に助言をいただきました。ありがとうございました。

6. 参考文献

化学発光

http://www.materials.sci.osaka-cu.ac.jp/materials2002/Lec_others/hakko.html

キリヤ化学 <http://www.kiriya-chem.co.jp/q&a/q16.html>

化学大辞典 大木 道則著 東京化学同人

