年間特集「光」：ノート

酸化モリブデン微粒子の表面増強フォトクロミック現象を利用した α -アミノ酸のラベルフリー定量法の開発

山本 麻実¹, 安達 健太^{*2,3}

1 緒言

金属オキソ酸（ポリオキソメタレート）は、前周期遷移金属の4～7族元素を含み、化学式 M_mO_n ($M=W, Mo, V, Ti, Al, Nb, Ta$ など) で表される金属酸化物集合体である。通常、金属オキソ酸は、金属原子中心に酸素原子が4配位または6配位した四面体あるいは八面体を基本骨格として、これが稜または頂点を介して結合した構造を有しており、金属の種類、その結合様式の違いにより様々な構造、そして多種多様な化学的性質を示す。金属オキソ酸は、その特異な着色特性から古来より比色分析に用いられてきた。なかでも水溶液中のリン酸イオンの定量に用いられるモリブデンブルー法が有名である。その測定原理は以下の通りである。酸性条件下、主として $H_2PO_4^-$ の状態で存在するリン酸イオンは、12個のモリブデン酸イオン (MoO_4^{2-}) と黄色のリンモリブデン酸イオン ($[PMo_{12}O_{40}]^{3-}$) を生成する。リンモリブデン酸イオンを含む水溶液に還元剤を加えると、12個の Mo^{6+} の一部が Mo^{5+} に還元された青色のモリブデンブルー ($[PMo_{12}O_{40}]^{n-}$; $n \geq 4$) に変化する。青色水溶液の色の濃さを調べることでリン酸イオンの濃度を定量できる¹⁾。このモリブデンブルー法では、金属オキソ酸の還元還元剤の添加を必要とするが、金属オキソ酸への光照射により発生する励起電子を金属オキソ酸自身の還元直接に活用できれば、分析手順の簡略化が図れ、金属オキソ酸を用いた比色分析の多様性が増す。

フォトクロミズム (Photochromism) とは『単一の化学種が、光的作用により分子量を変えずに、吸収スペクトルの異なる二つの状態間で可逆的に異性化する現象』を指す。金属オキソ酸のフォトクロミズムに関する研究は、L. Chalkley らによる、リンタングステン酸 ($H_3PW_{12}O_{40}$) を用いた写真用感光紙への応用が最初である²⁾。

最近の消費者の食に対する安全・安心志向や健康への関心の高まりもあって、食品中の α -アミノ酸の正確な定量手法の開発に関する試みが広く行われている^{3)~5)}。さらに医療現場において、生体中の α -アミノ酸の正確な検出は、早期の疾病発見・治療、あるいは疾病の予防のために非常に重要である。現在 α -アミノ酸分析法として、高速液体クロマトグラフィを用いたプレカラム/ポストカラム誘導体化法が広く利用されている⁶⁾。この分析法は、 α -アミノ酸の化学的誘導体化（ラベル化）によって高感度検出を可能としているが、測定用サンプルの調製には、熟練した技術を要し、その操作は煩雑で時間を要する現状がある。近年、誘導体化を必要としない新規 α -アミノ酸検出手法の開発が切望されている。

本研究では、金属酸化物半導体である酸化モリブデン (MoO_3) のフォトクロミズムを利用した誘導体化を必要としない α -アミノ酸化合物の新規比色センシング法の開発の一端を記載する。天然に存在する代表的な酸性、中性、塩基性 α -アミノ酸として、それぞれ L-アスパラギン酸 (Asp), L-ロイシン (Leu), L-リシン (Lys) を使用し、 MoO_3 コロイド粒子表面へのこれら α -アミノ酸吸着挙動と α -アミノ酸/ MoO_3 コロイド二成分系水溶液のフォトクロミック挙動に関して定量的評価を実施したのでここに報告する。

2 実験

2.1 試薬

MoO_3 コロイド水溶液の調製用に、モリブデン酸ナトリウム・2水和物（キシダ化学製）と塩酸（和光純薬工業製）を使用した。酸性、中性、塩基性 α -アミノ酸として、それぞれ L-アスパラギン酸 (Asp), L-ロイシン (Leu), L-リシン (Lys)（東京化成工業製, Fig. 1）を使用した。水溶液の pH, イオン強度の調整には、硫酸、または水酸化ナトリウム（和光純薬工業製）、硫酸ナトリウム（ナカライテクス製）を使用した。本研究で用いた水は、すべて Milli-Q Integral（メルク・ミリポア製）により精製した蒸留水である。

* E-mail: k-adachi@yamaguchi-u.ac.jp

¹ 山口大学大学院理工学研究科: 753-8512 山口県山口市吉田 1677-1

² 山口大学大学院創成科学研究科: 753-8512 山口県山口市吉田 1677-1

³ 山口大学光・エネルギー研究センター: 753-8511 山口県山口市吉田 1677-1

Fig. 1 [upper side] Chemical structure of L-aspartic acid, L-leucine, and L-lysine (acidic, neutral, and basic α -amino acid compounds, respectively)

pK_a values from CRC Handbook of Chemistry (2010) [lower side] Dissociation equilibria of α -amino acid compound forming dicationic form (DCF), cationic form (CF), zwitterionic form (ZF), anionic form (AF), and dianionic form (DAF).

2.2 MoO₃ コロイド水溶液の調製

既報の WO₃ コロイド水溶液の調製法⁷⁾を参考にして、MoO₃ コロイド水溶液を調製した。モリブデン酸ナトリウム・2水和物 10 g が溶解した水溶液 100 mL に、濃塩酸 10 mL を攪拌しながら、ゆっくりと滴下した。塩酸酸性モリブデン酸ナトリウム水溶液を透析用セルロースチューブ Cellu-Sep T1 (MWCO=3500) (メンブレン・フィルトレーション・プロダクツ製) に移し 8 時間透析操作を行うことで、約 0.12 M の MoO₃ コロイド水溶液 (pH~2.5) を得た。コロイド水溶液中のモリブデン全濃度 ([MoO₃]) は、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 Agilent 5100 (アジレント・テクノロジー製) を用いて定量した。

MoO₃ コロイド水溶液を室温で濃縮・乾燥して MoO₃ コロイド粒子粉末を得た。粉末 X 線回折装置 RINT-2500 (リガク製)、透過型電子顕微鏡 JEM-2100 (日本電子製)、及び自動比表面積測定装置トライスター II 3020 (島津製作所製) を用いて得られた粉末の特性評価を行った。その結果、MoO₃ コロイド粒子は、斜方晶結晶 (JCPDS 35-0609) を僅かに含む非晶質から成る 4~10 nm の球状粒子 (平均粒径: *ca.* 8 nm) であり、BET 比表面積 0.279 m² g⁻¹ を有すると明らかになった。Fig. 2 に示すように、MoO₃ コロイド水溶液の紫外・可視吸収スペクトルの吸収端の Tauc プロットから光学バンドギャップを求めたところ、3.21 eV となっ

Fig. 2 UV-Vis absorption spectrum of an as-prepared MoO₃ colloid aqueous solution

The inset shows a corresponding Tauc plot around the absorption edge for estimating the optical band gap energy.

た。この値は、非晶 MoO₃ にて報告されている値と一致する⁸⁾。

調製した MoO₃ コロイド水溶液は使用時まで暗所で保存した。

2.3 MoO₃ コロイド粒子表面への α -アミノ酸の吸着挙動測定

文献記載の方法³⁾に準拠して、MoO₃ コロイド粒子表面への α -アミノ酸の吸着挙動の測定を行った。規定濃度の MoO₃ コロイド水溶液と α -アミノ酸水溶液を混合し、硫酸ナトリウムでイオン強度を調整後、1 時間静置し α -アミノ酸/MoO₃ コロイド二成分系水溶液を作成した。その後、エキクロディスク 25 シリンジフィルター (日本ボール製) を通して、作成した二成分系水溶液を Mightysil RP-18 GP Aqua 250 (関東化学製) カラムを装備した高速液体クロマトグラフ Prominence (島津製作所製) に導入し、 α -アミノ酸濃度を定量した。MoO₃ コロイド粒子表面上への α -アミノ酸の吸着は、 α -アミノ酸水溶液への MoO₃ コロイド溶液添加前後の α -アミノ酸の波長 185 nm における吸光度の変化 (Δ Abs) より確認した。 α -アミノ酸/MoO₃ コロイド二成分系水溶液における Δ Abs の値は、以下のように定義される。

$$\Delta \text{Abs} = [\text{AA}]_{\text{ad}} \frac{\epsilon S}{V} \quad (1)$$

ここで、 $[\text{AA}]_{\text{ad}}$ は、MoO₃ コロイド粒子表面上に吸着した α -アミノ酸濃度 (mol dm⁻³) を示す。さらに ϵ , S , 及び V はそれぞれ、 α -アミノ酸の波長 185 nm におけるモル吸光係数 (mol⁻¹ dm³ cm⁻¹)、MoO₃ コロイド粒子の全表面積 (m²: BET 比表面積から計算) と水溶液体積 (dm³) である。

α -アミノ酸/MoO₃ コロイド二成分系水溶液の pH は、硫

Fig. 3 Adsorption isotherms of (a) Asp, (b) Leu, and (c) Lys molecules on the MoO_3 colloid surface at various pH values

The solid lines are the best fits to date to Eq.(2) (see text). Concentration conditions: $[\text{AA}] = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{MoO}_3] = 1.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 3.3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$.

酸と水酸化ナトリウムを用いて 2～6 の間で調整した。

2.4 α -アミノ酸/ MoO_3 コロイド二成分系水溶液のフォトクロミズム測定

MoO_3 コロイド水溶液と α -アミノ酸水溶液を混合したのち、硫酸ナトリウムを用いて二成分系水溶液のイオン強度を 0.1 mol dm^{-3} に、そして硫酸を用いて pH を 2 に調整した。その後、 α -アミノ酸/ MoO_3 コロイド二成分系水溶液をキャップ付石英ガラスセル ($1.0 \times 1.0 \times 5.0 \text{ cm}^3$) に入れて、窒素バブリングを 30 分間行った。石英セルを完全に密封したのち、 25°C に保持された水恒温槽に静置し、4 W ブラックライト 4 本 (東芝製: 最大発光波長 $\lambda_{\text{max}} = 352 \text{ nm}$) にて紫外線を照射した。紫外線照射時間に伴う吸収スペクトルの経時変化を紫外可視分光光度計 UV-1850 (島津製作所製) により追跡した。

3 結果と考察

3.1 MoO_3 コロイド粒子表面への α -アミノ酸の吸着挙動

α -アミノ酸は、金属酸化物・金属表面に静電性相互作用

用、水素結合、疎水性相互作用などの非共有結合性相互作用を介して容易に吸着することが知られている⁹⁾。 MoO_3 コロイド粒子表面には、 Mo-OH のような解離基が存在しており、水溶液と接する表面は、pH 条件に応じて水素イオンの解離と付加を生じるため電荷を帯びている。 MoO_3 の等電点 (pI_{MoO_3} : 表面電荷ゼロ点になる pH) は、 ~ 0.5 と報告されている¹⁰⁾。すなわち、本吸着実験条件下 (pH 2～6) では、水溶液中の MoO_3 コロイド粒子表面は、常に負に帯電していることになる。一方、 α -アミノ酸化合物は、分子中に酸性のカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) と塩基性のアミノ基 ($-\text{NH}_2$) を有するため、水溶液中では pH 条件に応じて陽イオン種、陰イオン種、そして分子内に正負の両電荷が存在する双性イオン種のいずれかで存在する。

Fig. 3 に、 α -アミノ酸/ MoO_3 コロイド二成分系水溶液の高速液体クロマトグラフ測定から得られた吸着等温線を示す。吸着等温線は、各アミノ酸によって異なり、また、その吸着挙動は水溶液中の pH に影響を受け変化することがわかる。得られた 3 種の α -アミノ酸の表面濃度変化は、ラングミュア吸着等温線に類似していた。水溶液中に複数の α -アミノ酸イオン種 (陽イオン種、陰イオン種、及び双性イオン種) が混在する本実験条件において、詳細な α -アミノ酸の吸着挙動の解析を行うには、単純なラングミュア吸着等温式は適していない。そこで α -アミノ酸各イオン種の酸解離平衡反応 (K_{a1} , K_{a2} , K_{a3} , K_{a4} : 数値は Fig. 1 参照) を考慮した下記ラングミュア吸着等温式を用いて、 MoO_3 コロイド粒子表面上における α -アミノ酸の吸着挙動を解析した。

$$[\text{AA}]_{\text{ad}} = \frac{aK'_{\text{DCF}}[\text{H}^+][\text{AA}]}{a(K_{a1}K_{a2}K_{a3}K_{a4} + K_{a1}K_{a2}K_{a3}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^4) + K'_{\text{DCF}}[\text{H}^+]^4[\text{AA}]} + \frac{aK'_{\text{CF}}K_{a1}[\text{H}^+][\text{AA}]}{a(K_{a1}K_{a2}K_{a3}K_{a4} + K_{a1}K_{a2}K_{a3}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^4) + K'_{\text{CF}}K_{a1}[\text{H}^+]^4[\text{AA}]} + \frac{aK'_{\text{ZF}}K_{a1}K_{a2}[\text{H}^+]^2[\text{AA}]}{a(K_{a1}K_{a2}K_{a3}K_{a4} + K_{a1}K_{a2}K_{a3}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^4) + K'_{\text{ZF}}K_{a1}K_{a2}[\text{H}^+]^4[\text{AA}]} + \frac{aK'_{\text{AF}}K_{a1}K_{a2}K_{a3}[\text{H}^+]^3[\text{AA}]}{a(K_{a1}K_{a2}K_{a3}K_{a4} + K_{a1}K_{a2}K_{a3}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^4) + K'_{\text{AF}}K_{a1}K_{a2}K_{a3}[\text{H}^+]^4[\text{AA}]} + \frac{aK'_{\text{DAF}}K_{a1}K_{a2}K_{a3}K_{a4}[\text{AA}]}{a(K_{a1}K_{a2}K_{a3}K_{a4} + K_{a1}K_{a2}K_{a3}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^4) + K'_{\text{DAF}}K_{a1}K_{a2}K_{a3}K_{a4}[\text{AA}]} \quad (2)$$

a は MoO_3 コロイド粒子表面における α -アミノ酸の飽和表面濃度 (mol dm^{-2}) を示す。また $[\text{AA}]$, 及び $[\text{AA}]_{\text{ad}}$ は、水溶液中の α -アミノ酸濃度 (mol dm^{-3}), MoO_3 コロイド粒子表面に吸着した α -アミノ酸濃度 (mol dm^{-2}) であり、それぞれ式 (3), (4) と定義する。

$$[\text{AA}] = [\text{DCF}] + [\text{CF}] + [\text{ZF}] + [\text{AF}] + [\text{DAF}] \quad (3)$$

$$[\text{AA}]_{\text{ad}} = [\text{DCF}]_{\text{ad}} + [\text{CF}]_{\text{ad}} + [\text{ZF}]_{\text{ad}} + [\text{AF}]_{\text{ad}} + [\text{DAF}]_{\text{ad}} \quad (4)$$

$[\text{DCF}]$, $[\text{CF}]$, $[\text{ZF}]$, $[\text{AF}]$, 及び $[\text{DAF}]$ は、それぞれジカチオン種, カチオン種, 双性イオン種, アニオン種, 及

Table 1 Saturated concentrations (a), adsorption constants of dicationic form (DCF), cationic form (CF), zwitterionic form (ZF), anionic form (AF), and dianionic form (DAF) of various α -amino acids onto the MoO_3 colloid surface (K'_{DCF} , K'_{CF} , K'_{ZF} , K'_{AF} , and K'_{DAF} , respectively)

α -amino acid	type	$a / \text{mol dm}^{-2}$	Adsorption constant				
			$K'_{\text{DCF}} / \text{dm}$	$K'_{\text{CF}} / \text{dm}$	$K'_{\text{ZF}} / \text{dm}$	$K'_{\text{AF}} / \text{dm}$	$K'_{\text{DAF}} / \text{dm}$
Asp	acid	$(2.13 \pm 0.25) \times 10^{-8}$	-----	$(7.91 \pm 0.31) \times 10^{-4}$	$(8.31 \pm 0.24) \times 10^{-6}$	$(2.91 \pm 0.19) \times 10^{-6}$	not obtained
Leu	neutral	$(2.63 \pm 0.09) \times 10^{-8}$	-----	$(6.41 \pm 0.12) \times 10^{-4}$	$(5.51 \pm 0.11) \times 10^{-6}$	not obtained	-----
Lys	base	$(3.65 \pm 0.12) \times 10^{-8}$	$(9.61 \pm 0.38) \times 10^{-4}$	$(4.25 \pm 0.18) \times 10^{-4}$	not obtained	not obtained	-----

Fig. 4 Typical absorption spectral changes of (a) as-prepared MoO_3 , (b) Asp/ MoO_3 , (c) Leu/ MoO_3 , and (d) Lys/ MoO_3 binary aqueous solution under UV light irradiation

Insets in (a) and (b) are enlarged spectra ($\times 10$). Concentration conditions: $[\text{MoO}_3] = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{AA}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 3.3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, pH 2.1.

びジアニオン種 α -アミノ酸の水溶液中の濃度 (mol dm^{-3}) を表わす。また、添え字の “ad” は MoO_3 コロイド粒子表面上の濃度 (mol dm^{-2}) を示す。また α -アミノ酸イオン種それぞれの MoO_3 コロイド粒子表面への吸着平衡定数は以下のように定義される。

$$K'_{\text{DCF}} = \frac{[\text{DCF}]_{\text{ad}}}{[\text{DCF}]} \quad (5)$$

$$K'_{\text{CF}} = \frac{[\text{CF}]_{\text{ad}}}{[\text{CF}]} \quad (6)$$

$$K'_{\text{ZF}} = \frac{[\text{ZF}]_{\text{ad}}}{[\text{ZF}]} \quad (7)$$

$$K'_{\text{AF}} = \frac{[\text{AF}]_{\text{ad}}}{[\text{AF}]} \quad (8)$$

$$K'_{\text{DAF}} = \frac{[\text{DAF}]_{\text{ad}}}{[\text{DAF}]} \quad (9)$$

各 pH 条件下における詳細な吸着等温線解析から得られた 3 種 α -アミノ酸の吸着パラメータを Table 1 にまとめる。ジアニオン種 Asp, アニオン種 Leu, 及びアニオン種と双性イオン種 Lys の吸着定数は、本吸着実験条件下 (pH 2~6) において水溶液中の濃度が非常に低いため算出できなかった。興味深いことに、ジカチオン種、カチオン種の α -アミノ酸は、双性イオン種、アニオン種のそれと比較して、100 倍以上吸着しやすいとわかる。この結果は、 α -アミノ酸と MoO_3 コロイド粒子表面との静電的相互作用が吸着現象の最大の駆動力であると証明している。

3.2 MoO_3 表面増強フォトクロミック現象を利用した α -アミノ酸比色センシング

最近、著者らの研究グループは酸化タングステン (WO_3) 表面に $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ 等特定の置換基を有する有機化合物が吸着することで、 WO_3 のフォトクロミズムが飛躍的に増強する「表面増強フォトクロミック現象」を報告した³⁾¹¹⁾¹²⁾。一般に MoO_3 のフォトクロミズム発現メカニズムは、 WO_3 と類似しているため¹³⁾、 MoO_3 による表面増強フォトクロミック現象を期待できる。

Fig. 4 に紫外線照射に伴う α -アミノ酸/ MoO_3 コロイド二成分系水溶液の典型的な可視吸収スペクトル変化を示す。比較として、 α -アミノ酸を含まない MoO_3 コロイド水溶液の結果も記載する。紫外線照射前の α -アミノ酸/ MoO_3 コロイド二成分系水溶液は無色透明であったが、紫外線照射に伴い明瞭に青色着色し、 MoO_3 のフォトクロミ

Fig. 5 Typical time profiles of the absorbance at 823 nm of as-prepared MoO_3 and various α -amino acid/ MoO_3 binary aqueous solution under UV light irradiation at pH 2.1

Concentration conditions: $[\text{MoO}_3] = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{AA}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 3.3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$.

ズムに特徴的な波長 823 nm にピークトップを有する新しい吸収帯が出現した。その吸収帯の裾は可視部に及んでいた。

二成分系水溶液中に含まれる α -アミノ酸の違いにより、その着色挙動は大きく異なった。例えば、紫外線照射 10 分後における Lys/ MoO_3 コロイド二成分系水溶液の波長 823 nm における吸光度は、Asp/ MoO_3 コロイド二成分系水溶液のそれと比較して約 20 倍大きい値を示した。一方、 α -アミノ酸を含まない MoO_3 コロイド水溶液に対しても同様に紫外線照射を 10 分間行ったが、目視上着色を確認できなかった。また波長 823 nm における吸光度変化も無視できるほど小さかった。(Fig. 4 (a) 参照) これら結果から、二成分系水溶液中の α -アミノ酸の存在が MoO_3 コロイド粒子のフォトクロミズムを増強しているのは明白であり、またその増強の度合いは種々 α -アミノ酸によって異なると判明した。

α -アミノ酸による MoO_3 フォトクロミズムの増強メカニズムを明らかにすべく、 α -アミノ酸/ MoO_3 コロイド二成分系水溶液の紫外線照射下における吸光度の経時変化を調査した。Fig. 5 に示すように、 α -アミノ酸ごとに違いはあるものの、紫外線照射時間増加に伴い、最大吸収波長 823 nm における吸光度は比例して増加する傾向を示した。

前セクションにて算出した各アミノ酸の種々吸着パラメータを用いることで、 MoO_3 コロイド粒子表面に吸着した種々 α -アミノ酸濃度を容易に見積ることができる。波長 823 nm における吸光度と紫外線照射時間との比例関係から得られる直線の傾きをフォトクロミズムにおける着色速

Fig. 6 Dependence of the coloration rate (r_0) on the concentration of α -amino acid adsorbed on the MoO_3 colloid surface ($[\text{AA}]_{\text{ad}}$)

The straight line indicates the best-fitting curves obtained by the least-squares method. The magnitude of the error bars was calculated from the uncertainty given by five independent measurements with the other batch aqueous solutions.

度 r_0 と定義し、 MoO_3 コロイド粒子表面に吸着した種々 α -アミノ酸濃度との関連性について精査した。大変興味深い事に、 α -アミノ酸表面濃度の増加に伴い、 r_0 の値は直線的に増加した (Fig. 6 参照)。これら結果から、 α -アミノ酸/ MoO_3 コロイド二成分系水溶液におけるフォトクロミズム増強には、 MoO_3 コロイド粒子表面に吸着した α -アミノ酸分子のみが関与していると判った。本研究の結果は、 α -アミノ酸/ WO_3 コロイド二成分系水溶液にて実証された「表面増強フォトクロミック現象」の結果を同様に支持する³⁾。Fig. 6 において、各 α -アミノ酸で直線の傾きが異なる、すなわち各 α -アミノ酸で MoO_3 のフォトクロミズムの増強度合いが異なる理由については、以下のセクションにて考察する。

各 α -アミノ酸表面濃度 $[\text{AA}]_{\text{ad}}$ と着色速度 r_0 との直線関係から得られる近似直線の相関係数 R^2 は、0.98 以上であり、水溶液中に含まれる各 α -アミノ酸濃度定量の検量線として十分に使用できる。JIS K 0211 規定ほかに基づき¹⁴⁾¹⁵⁾、本実験系の α -アミノ酸の定量下限を算出した。その結果は以下の通りである。Asp: $2.42 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-2}$ ($3.45 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$), Leu: $1.27 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-2}$ ($2.08 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$), Lys: $0.991 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-2}$ ($1.53 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) 【※ () 内は、各吸着パラメータを用い水溶液中の初期 α -アミノ酸濃度に換算した値】。この結果は、 MoO_3 表面増強フォトクロミック現象を利用した比色センシング法が、生体中や食品中サンプル中の α -アミノ酸検出に十分適用できる可能性を示している。

3・3 α -アミノ酸/MoO₃コロイド二成分系水溶液のフォトクロミズム増強メカニズムに関する考察

一般的にMoO₃のフォトクロミズムは系中に存在するカチオン種と励起電子の電気化学的な共挿入モデルにより以下のように説明される¹⁶⁾。

金属酸化物半導体であるMoO₃にバンドギャップエネルギーより高いエネルギーを有する紫外線を照射した場合、電子(e⁻)が伝導帯に励起され、一方で価電子帯にホール(h⁺)が生成する。ホールはMoO₃近傍に存在する水分子のO-H結合に作用し、結果として水分子をプロトン(H⁺)と高い反応性を有する酸素ラジカルへと分解する。生成した酸素ラジカルはお互いに結合し酸素分子の状態で系外へと取り除かれる。一方、生成したH⁺はMoO₃中の配位酸素O²⁻に結合し、結果として水分子を生成することで系中の電荷補填の役割を担う。すなわち、MoO₃へ紫外線を照射することで生成した励起電子・ホールペアは、Mo⁶⁺からMo⁵⁺への自己還元を促し、結果としてフォトクロミズムを発現する。実際に多くの研究者が、有機化合物から[MoO₆]八面体中心へのプロトン供給がMoO₃のフォトクロミズムを増強している可能性があるとして報告している¹⁷⁾¹⁸⁾。

また山瀬らによるMoO₃と有機アンモニウム(NH₃R⁺)複合材料の研究¹³⁾によると、以下のようなフォトクロミズムに関するメカニズムが提案されている。MoO₃-NH₃R⁺複合材料のフォトクロミズムは、固体結晶中のMo^{VI}=O結合の末端配位酸素からモリブデン中心への電荷移動(LMCT)吸収帯への光照射によって起こる。すなわち、MoO₃-NH₃R⁺複合材料への光照射の結果、[NH₃R⁺]の水素結合プロトンが架橋酸素へと移動すると同時にO→Mo LMCT吸収帯への光励起によって生じた酸素原子上のホールが[NH₃R⁺]の窒素原子上の孤立電子対により安定化される。結果として、励起電子とホールの空間的電荷分離が起こり、安定な電荷移動錯体が生成されることでフォトクロミズムが発現する。

本研究において、MoO₃コロイド粒子表面への種々 α -アミノ酸の吸着挙動を観測し詳細な解析を行った結果、 α -アミノ酸は正に帯電したアミノ基(-NH₃⁺)の静電的相互作用を介してMoO₃コロイド粒子表面へと吸着していると明らかにした。上記MoO₃のフォトクロミズムに関する知見に鑑みて「水素結合の存在と安定な電荷移動錯体の形成がフォトクロミズムの発現に重要な役割を果たしている」と

仮定すれば、MoO₃コロイド粒子表面に静電吸着した α -アミノ酸と表面[MoO₆]八面体との錯体の安定度が、「表面増強フォトクロミック現象」の増強度合いを左右する可能性がある。この仮説を証明すべく、著者らは種々有機化合物、及びアミノ酸類似体を使ったオキシ酸化合物コロイド粒子のフォトクロミズムに関する研究を現在実施中である。

4 結 言

酸化モリブデン(MoO₃)のフォトクロミズムを利用した新規 α -アミノ酸比色センシング法の開発を目的に、MoO₃コロイド粒子表面における α -アミノ酸の吸着挙動、及び α -アミノ酸がMoO₃コロイド粒子のフォトクロミズムに及ぼす影響について調査した。またこれらの研究結果をふまえて、金属オキシ酸の「表面増強フォトクロミック現象」メカニズム解明を指向した。

実験結果の詳細な解析から、 α -アミノ酸は酸性、中性、塩基性の種類を問わず正に帯電した分子内のアミノ基(-NH₃⁺)と負に帯電したMoO₃コロイド粒子表面との静電的相互作用を駆動力として単分子吸着すると明らかとなった。また、 α -アミノ酸/MoO₃コロイド二成分系水溶液中にて、MoO₃コロイド粒子表面に吸着した α -アミノ酸のみがMoO₃フォトクロミズムの増強に関与すると定量的に証明した。 α -アミノ酸表面濃度とフォトクロミック着色速度との直線関係から、水溶液中に含まれる α -アミノ酸濃度を10⁻⁶ mol dm⁻³オーダーで定量できると示した。単に検出限界値の面から見れば、MoO₃フォトクロミズムは、食品や生体サンプル中の α -アミノ酸濃度検出に十分適用できる。しかし、MoO₃の表面増強フォトクロミック現象には分子選択性が認められないため、種々 α -アミノ酸化合物が共存する水溶液中から特定の α -アミノ酸化合物のみを選択的にセンシングするのは現行では困難である。また、本研究におけるMoO₃の表面への α -アミノ酸吸着の駆動力は主として静電的相互作用であり、測定サンプル中の夾雑物質やイオン性物質、すなわちイオン強度に大きく影響を受けることが予想される。水溶液系におけるアミン官能基を有する分子の金属酸化物コロイド表面との静電的相互作用を介した吸着は、イオン強度の増加に伴い阻害されると報告されている¹⁹⁾²⁰⁾。今後、MoO₃ナノコロイド粒子の表面修飾により、イオン強度等に影響されない α -アミノ酸の吸着能、及び分子選択性を付与できれば更にフォトクロミックセンシングプローブとしての期待が高まるであろう。

オキシ酸化合物の「表面増強フォトクロミック現象」は、オキシ酸表面に吸着した化学種の状態・性質を反映している可能性が大きい。様々な有機化合物/オキシ酸化合物のフォトクロミック挙動を系統的に調査していくことで、「表面増強フォトクロミック現象」を支配する吸着有機分

子の特性が明らかにできると考えている。今後、光照射によるオキシ酸の特異な着色特性を利用した定性・定量分析法の更なる発展に期待したい。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費(No.16K05817・No.24750069)の助成を受けたものである。本研究の粉末X線回折分析、誘導結合プラズマ発光分光分析、透過型電子顕微鏡測定は、山口大学機器分析実験施設、及び山口大学やまぐちイノベーション創出推進拠点の協力を得て行った。ここに記して深謝する。

(平成26年9月19日、日本分析化学)
会第63回年会において、一部発表

文 献

- 1) 興石一郎, 今成登志男 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **34**, 128 (1985).
- 2) L. Chalkley : *Chem. Rev.*, **6**, 217 (1929).
- 3) S. Tanaka, K. Adachi, S. Yamazaki : *Analyst*, **138**, 2536 (2013).
- 4) Y. Li, Y. Duan, J. Li, J. Zheng, H. Yu, R. Yang : *Anal. Chem.*, **84**, 4732 (2012).
- 5) F. R. Antoine, C. I. Wei, R. C. Littell, M. R. Marshall : *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 5100 (1999).
- 6) 日本分析化学会 (編集) : “アミノ酸・生体アミン分析 試料分析講座” (2012), (丸善出版).
- 7) K. Adachi, T. Mita, T. Yamate, S. Yamazaki, H. Takechi, H. Watarai : *Langmuir*, **26**, 117 (2010).
- 8) J. W. Rabalais, R. J. Colton : *Chem. Phys. Lett.*, **29**, 131 (1974).
- 9) A. Vallee, V. Humblot, C.-M. Pradier : *Acc. Chem. Res.*, **43**, 1297 (2010).
- 10) M. A. Carreon, V. V. Gulians : *Eur. J. Inorg. Chem.*, 27 (2005).
- 11) S. Yamazaki, H. Ishida, D. Shimizu, K. Adachi : *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **7**, 26326 (2015).
- 12) K. Adachi, T. Mita, S. Tanaka, K. Honda, S. Yamazaki, M. Nakayama, T. Goto, H. Watarai : *RSC Adv.*, **2**, 2128 (2012).
- 13) T. Yamase : *Chem. Rev.*, **98**, 307 (1998).
- 14) JIS K 0211, 分析化学用語 (基礎部門), (2005).
- 15) L. A. Currie : *Anal. Chem.*, **40**, 586 (1968).
- 16) L. Zheng, Y. Xu, D. Jin, Y. Xie : *Chem. Mater.*, **21**, 5681 (2009).
- 17) X. Sha, L. Chen, A. C. Cooper, G. P. Pez, H. Cheng : *J. Phys. Chem. C*, **113**, 11399 (2009).
- 18) U. Tritthart, A. Gavriluk, W. Gey : *Solid State Commun.*, **105**, 653 (1998).
- 19) K. Adachi, K. Watanabe, S. Yamazaki : *Ind. Eng. Chem. Res.*, **53**, 13046 (2014).
- 20) N. Kanetada, C. Matsumura, S. Yamazaki, K. Adachi : *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **5**, 12991 (2013).

Label-free Colorimetric Sensing of α -Amino Acids Based on Surface-enhanced Photochromic Phenomena of Molybdenum(VI) Oxide Nanoparticles

Asami YAMAMOTO¹ and Kenta ADACHI^{*2,3}

* E-mail : k-adachi@yamaguchi-u.ac.jp

¹ Department of Environmental Science & Engineering, Graduate School of Science & Engineering, Yamaguchi University, 1677-1, Yoshida, Yamaguchi-shi, Yamaguchi 753-8512

² Department of Chemistry, Graduate School of Sciences & Technology for Innovation, Yamaguchi University, 1677-1, Yoshida, Yamaguchi-shi, Yamaguchi 753-8512

³ Opto-Energy Research Center, Yamaguchi University, 1677-1, Yoshida, Yamaguchi-shi, Yamaguchi 753-8511

(Received March 23, 2017; Accepted May 8, 2017)

Due to the biological importance of α -amino acids and their derivatives, the development of novel colorimetric probes for these molecules has been an active research area in recent years. In this study, surface-enhanced photochromic phenomena by various α -amino acids (L-aspartic acid [Asp], L-leucine [Leu], and L-lysine [Lys]) adsorbed on molybdenum(VI) oxide (MoO_3) nanoparticles in an aqueous system were investigated by means of UV-vis absorption spectrometry. No derivatization of α -amino acids is required, and eventually highly accurate determinations are obtained from the UV-induced MoO_3 photochromic coloration. Under optimal conditions in this system, limit of quantitation (LOQ) values of 3.45×10^{-6} , 2.08×10^{-6} , and $1.53 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ for Asp, Leu, and Lys, respectively, were achieved at pH 2. During UV irradiation, the detection process could be visually observed by naked eyes. A simple and unique approach to explore sensitive "label-free" colorimetric sensing toward α -amino acids is proposed.

Keywords: α -amino acid; molybdenum(VI) oxide; adsorption; photochromism; label-free colorimetric sensing.