

学位論文

分散した微粒子による固相抽出を原理とする新しい
簡易比色分析法の開発と環境水への応用

A novel simple colorimetry based on solid-phase extraction with
dispersed particulates and its applications to environmental water samples

富山大学院 理工学教育部（理学） 地球生命環境科学専攻

小濱 望

目次

第1章 緒言	6
1.1. はじめに	6
1.2. 簡易分析法	7
1.3. 分散した微粒子による固相抽出を原理とした簡易分析法の着想に至った経緯	8
1.4. 分散微粒子抽出法の原理と操作	9
1.5. 本研究の目的	10
1.6. 参考文献	10
第2章 分散微粒子抽出/比色分析法における吸着捕集の仕組み—アンモニア, ニッケル, 鉄(II)の分析法の開発—	14
2.1. はじめに	14
2.2. フェノール色素の吸着を利用したアンモニアの比色測定	14
2.2.1. 目的成分を有色の陰イオンに変換して捕集する場合	14
2.2.2. 分析法の開発	15
2.3. Ni(II)-PAR 錯体の吸着を利用したニッケルの比色測定	17
2.3.1. 条件によって電荷が変化する成分の捕集について	17
2.3.2. 分析法の開発	18
2.4. 鉄(II)-フェナントロリン錯体の吸着を利用した鉄(II)の簡易分析法の開発	19
2.4.1. 目的成分を有色の陽イオンに変換して捕集する場合	19
2.4.2. 鉄(II)について	20
2.4.3. 分析法の開発	21
2.4.4. 結果と考察	22
2.4.5. 実試料への応用	29
2.5. まとめ	32
2.6. 参考文献	32
第3章 亜硝酸の簡易分析法—微粒子が与える呈色反応速度への影響—	34
3.1. はじめに	34
3.1.1. 本研究における捕集形態について	34
3.1.2. 亜硝酸 (NO_2^-) の性質	35
3.2. 分析法の開発	36
3.2.1. 実験	36
3.2.2. 結果と考察	37
3.2.3. 実試料への応用	42
3.3. まとめ	43
3.4. 参考文献	43

第4章 ホルムアルデヒドの簡易比色分析法—微粒子の吸着力が測定へ与える影響—	45
4.1 はじめに	45
4.1.1. 本研究における捕集形態について	45
4.1.2. ホルムアルデヒドについて	46
4.2. 分析法の開発	46
4.2.1. 実験	46
4.2.2. 結果と考察	47
4.2.3. 実試料への応用	51
4.2.4. 捕集のデータの解析	53
4.3. まとめ	55
4.4. 参考文献	56
第5章 酵素法を用いたリン酸の高感度な簡易分析法の開発—微粒子の物理的な性状が測定へ与える影響—	57
5.1 はじめに	57
5.1.1. 酵素法とは	57
5.1.2. 本研究の捕集形態について	57
5.1.3. リン酸について	58
5.2. 分析法の開発	59
5.2.1. 実験	59
5.2.2. 結果と考察	60
5.2.3. 実試料への応用	68
5.3. まとめ	69
5.4. 参考文献	69
第6章 6価クロム (Cr(VI)) の簡易分析法の開発—微粒子への抽出種の推定—	71
6.1 はじめに	71
6.1.1. 本研究の捕集形態について	71
6.1.2. Cr(VI)について	72
6.2. 分析法の開発	72
6.2.1. 実験	72
6.2.2. 結果と考察	74
6.2.3. 実試料への応用	79
6.2.4. イオン対 SPE と化学量論に関する平衡研究	81
6.3. まとめ	84
6.4. 参考文献	84
第7章 過マンガン酸イオンの吸着を利用した簡易分析法の開発—Mn と化学的酸素要求量 (COD) の測定—	88

7.1. はじめに	88
7.2. Mnの簡易分析法の開発	88
7.2.1. 本研究の捕集形態について	88
7.2.2. Mn ²⁺ について	88
7.2.3. 分析法の開発	89
7.2.4. 結果と考察	90
7.3. 化学的酸素要求量(COD)の簡易分析法の開発	96
7.3.1. 本研究の捕集形態について	96
7.3.2. CODについて	96
7.3.3. 分析法の開発	98
7.3.4. 結果と考察	100
7.4. まとめ	111
7.5. 参考文献	111
第8章 遊離シアン化合物(CN ⁻)の簡易分析法の開発 一分散微粒子抽出法に適した小型 撮影ボックスの開発一	113
8.1. はじめに	113
8.1.1. 本研究の捕集形態について	113
8.1.2. シアン化合物について	114
8.1.2. 現場分析のための携帯機器	115
8.2. 分析法の開発	115
8.2.1. 実験	115
8.2.2. 結果と考察	116
8.3. まとめ	128
8.4. 参考文献	129
第9章 蛍光測定法への応用 一微粒子への蛍光体の吸着と蛍光画像測色法一	131
9.1. はじめに	131
9.1.1. 本研究の捕集形態について	131
9.1.2. 蛍光測定法	131
9.2. 分析法の開発	132
9.2.1. 実験	132
9.2.2. 結果と考察	133
9.3. まとめ	141
9.4. 参考文献	141
第10章 総括	143

要約

近年、医療、環境、工業などの様々な分野の現場において、迅速で簡便な分析法の重要性が増している。反面、それら簡易分析法の感度や精度、選択性が不足し、正確な判断ができないことがしばしば問題となっている。

これまでにこれらの問題を打破すべく分離科学の視点から固相抽出や溶媒抽出により測定物質を濃縮分離する前処理法や機器が開発されてきた。しかしそれらは一様に、目的成分の呈色反応、分離・濃縮、測定の各工程が別々に分かれている。工程が細分化し、試料の前処理や高感度化などの付加的な操作は“簡易分析”の意図を損なう結果となっている。

そこで本研究では、水中の目的成分の呈色と分散した微粒子による分離・濃縮のプロセスを同一容器内で同時進行させる新しい簡易分析システムの開発をスタートさせた。この開発の基礎となった新規の分離・濃縮法を「分散微粒子抽出法」と名付けた。一つの容器内で①目的成分の呈色反応、②着色成分の微粒子への吸着/濃縮、③微粒子の自重による分離が同時進行で起こり、微粒子の色調を目視や画像解析によってそのまま速やかに測定できる。

環境水中の微量成分 (Fe^{2+} , Ni^{2+} , NH_4^+ , NO_2^- , HCHO , PO_4^{3-} , Cr(VI) , Mn^{2+} , COD , CN^- , H_2O_2) を研究の対象成分とした。現場分析の視点から測定感度や選択性、分析の操作性などを考慮して優れた簡易分析法を開発し、さらに環境試料に応用しその有用性を確かめた。それらの研究成果を学位論文として報告する。

開発した方法の操作概略

本法の測定操作は非常に簡便・迅速である。つまり、呈色試薬（粉末）と微粒子を入れた容器に試料水（1 mL）を採り、軽く振った後、静置する。沈積した微粒子の色調を目視や画像解析で判定し、濃度を求める。20分以内で測定できるので、現場分析に適している。

固相抽出系の設計と得られた知見

目的成分の呈色反応はそれぞれ既存法の中から汎用性の高いものを選んだ。この研究では呈色成分の捕集が非常に重要である。呈色成分の化学的特性に応じた抽出系を設計し、微粒子の素材を選択した。以下に用いた主な抽出系と開発中に見出された知見を述べる。

(1)イオン交換による捕集： Fe^{2+} は有色錯陽イオンとしてシリカゲル、 NH_4^+ は陰イオン色素として陰イオン交換樹脂で捕集した。 HCHO の分析では呈色目的成分（青色）と過剰の試薬（黄色）いずれも陽イオンを生成するため、微粒子の素材によって色調が大きく異なった。この違いの原因を両成分の吸着平衡の解析から明らかにした。 NO_2^- の場合、陽イオン色素に変換し、プロピルスルホン酸修飾シリカゲルで捕集した。その際、微粒子の着色速度が溶液中での呈色速度よりも約2倍速くなり、測定時間が短縮された。微粒子による呈色促進効果を確認した。 Mn^{2+} は MnO_4^- として陰イオン交換体に捕集した。開発した MnO_4^- の捕集法を COD の測定法へ応用することができた。

(2)複合的な相互作用による捕集： Ni^{2+} の有色錯体は pH によって電荷が変化する。陰イオ

ンを捕集する機能と中性成分を捕集する機能を合わせ持つ微粒子を作製して良好な結果を得た。 PO_4^{3-} は双性イオンに変換して、XAD-7HP（親水性の無電荷粒子）へ捕集できた。この抽出系では微粒子の粒径が吸着定数や粒子の沈降速度に与える影響を調べた。

(3)イオン対の生成を利用する捕集：Cr(VI)の有色錯陽イオンの場合，対イオンとしてドデシル硫酸陰イオンを添加し，イオン対に変換し，XAD-7HP によって捕集できた。イオン対抽出平衡モデルから対イオンを選択し，さらに捕集成分の化学形を推定した。また， H_2O_2 の蛍光分析に用いたレゾルフィン（陰イオン）の場合，Zephiramine[®]を対イオンとするイオン対抽出系を設計し，シリカゲルで捕集できた。Zephiramine[®]濃度に応じて静電相互作用と疎水性相互作用が逐次関与する複雑な捕集機構を明らかにした。

画像解析による高感度化と環境水への応用

微粒子層をスマートフォン等で撮影し，その画像の色情報を解析することで，目視法よりも客観的で，より感度が高く，再現性のよいデータを得ることができた。本法を，環境水（河川水，地下水，雨水，海水）に適用したところ，いずれの測定結果も機器分析法等とよく一致した。

開発した方法は目視測定で水相の比色測定よりも 2～10 倍高感度であり，画像処理によってさらに高感度で信頼性の高い結果が得られた。また，微粒子の素材，粒径，添加量等によって測定範囲を幅広く調節できた。試料水中の着色成分の影響も低減された。微粒子による呈色速度の促進効果は分析操作の短縮に繋がる発見である。研究では分散微粒子抽出法を環境水の簡易分析へ応用したが，種々の分野においてラボベースでの応用も期待できる。

第1章 緒言

1.1. はじめに

2020年新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が世界的に大流行し、これに伴って、世界中でCOVID-19の感染の有無を簡便に判定できる検査キットが普及した。また、世界各地で異常気象が頻発し、大規模な自然災害が多発している。その中でも大量の降雨がもたらす洪水は河川水を波乱させ、汚水が水源に流れ込むことで飲み水に致命的な打撃を与える。飲み水の安全性をその場で確認する検査キットの重要性は高い。更に、地球規模の環境問題や気候変動の動向に伴った世界社会の大きな流れとして、2015年に国連サミットで持続可能な開発目標（Sustainable Development Goals：SDGs）が掲げられ、2030年を年限とした達成すべき17の国際目標が設定された。また、農業や環境、工業の現場において、物質の変動の詳細を多角的に見極めることができるスクリーニング検査も必要である。このような社会背景の下、簡易分析法は、近年、医療、環境、工業などの様々な分野の現場において、迅速で簡便な分析法として、その重要性が高まっている。その反面、既存の簡易分析法の感度や精度、選択性に改善の余地がある場合が多く、正確な判断のツールとして利用できない場合がしばしばあることが問題となっている。

これまでに、既存の簡易分析法の問題を打破すべく、分離科学の視点から固相抽出や溶媒抽出を利用することにより、分析対象物質を濃縮・分離する前処理法や機器分析法が開発されてきた。しかし、一様にそれらの方法は、目的成分の呈色反応、分離・濃縮、測定各工程が分かれている。分析工程の細分化は試料の前処理や高感度化などの付加的な操作を加えることになるため、“簡易分析”の意図を損なう結果となることが多い。

そこで本研究では、水中の目的成分の呈色と分散した微粒子による分離・濃縮のプロセスを同一容器内で同時進行させる新しい簡易分析システムの開発を2017年にスタートさせた。この開発の基礎となった新規分離・濃縮法を「分散微粒子抽出法」と名付けた。この固相抽出法を利用した簡易比色分析法は、一つの容器内で、①目的成分の呈色反応、②着色成分の微粒子への吸着/濃縮、③微粒子の自重による分離を同時進行させ、微粒子の色調を目視や画像解析によって速やかに測定することで分析対象物質を定量する手法である。

本研究では、特に環境水中の微量成分を研究の対象物質とし、現場分析の視点から測定感度や選択性、分析の操作性などを考慮して優れた簡易分析法を開発し、さらに環境試料に応用することでその有用性を明らかにした。

1.2. 簡易分析法

簡易とは、「てがるなこと。たやすいこと。」(広辞苑 第六版より引用)であり、操作性に係わる言葉である。操作が簡便であれば、誰でも使うことができる。この「誰でも」を補う要素として、測定者の安全性や経済性、迅速性の確保が必要である。さらに利便性を向上するために、分析器具(装置)の小型化・携帯性で場所を選ばずにどこでも分析ができる。「簡易」という用語には、安っぽいという先入観が付きまとうが、簡易分析法の設計は決して簡易ではない。最先端の知識や技術が集積してはじめて達成される高度なテクニクである。

簡易分析とは、誰でもどこでも簡単に測定できる分析法全般をいい、特定の測定方法や、機器を指すものではない。具体的には以下の条件を兼ね備えたものである。

- ① 簡易性…煩雑な操作を必要とせず、だれでも測定できる。
- ② 迅速性…測定開始からわずかな時間で検出できる。
- ③ 可搬性…持ち運び可能で、どこでも測定ができる。

以上が一般的にいわれている“簡易分析”の特徴であるが、一方で

- ④ 経済性…安価な方法が望ましい(最近では市民レベルでの環境調査においても用いられているため低い価格が望ましい)。
- ⑤ 安全性…毒物及び劇物取締法に該当する試薬を使用しない事。

これらの要素は、誰でも利用できる分析法として忘れてはならない重要な点である[1, 2]。

近年では、簡易分析法は、研究分野や医療、環境、工業、農業、教育現場など多岐にわたって使用され、IoT や AI の発展に伴って様々な分野で重要な役割を担っている[3-11]。例えば、非破壊検査として X 線や分光器を用いた機器分析法や電子センサー[12]、薄層クロマトグラフィー[13-17]、ナノ粒子を用いたイノムアッセイ[18-22]なども報告されている。更に、毛細管現象を利用し、試料水を滴下するだけで分析できる、ろ紙上に流路を施した紙基板分析デバイス[23-27]の開発に関しても近年報告数が激増している。

このように様々な簡易分析法がある中で、比色分析とは、試料中の目的成分を色の濃さや色調から濃度を決定する分析方法であり、標準色を用いた目視測定[28-30]や分光器による測定が用いられている。しかし、紙基盤デバイスのような発色層の厚みが薄い場合、しばしば感度が不足するといった問題が生じる。一方で、溶液を測定するパックテスト®[31, 32]は発色した液相にある程度厚みがあり、感度化が保たれている。更に、固相抽出(solid-phase extraction : SPE) [12, 33, 34]を用いて、メンブランフィルター[35-44]上に呈色した目的成分を分離・濃縮する膜捕集を組み合わせることで、感度と精度の改善が図られているが、分析操作が煩雑で、簡易分析法としての簡便性を損なわせている。また、比色法の最も重大な欠点は、試料水に含まれる着色成分や懸濁物質による妨害を強く受けるため、前処理法が必要になる点である。試料水のバックグラウンドの色が分析精度に無視できない干渉を与え、場合によっては目的成分の定量のみならず、検出すらできない。

環境、食品、医療分野におけるいずれの場合においても、色や懸濁成分を含んでいる試料水が多い。例えば、途上国の汚染された環境水などは、極めて透明度が低いことが普通である。ろ過を施しても、しっかりと色が残っている場合が多く、現存の簡易分析法は使い物にならない。また、目視分析の場合、色の濃淡の判定には、測定者の色覚の強弱によって分析結果が大きく変動し、分析法の信頼性にも問題がある。そのため、これらの課題を解決しプロの要求にも対応できる高性能な簡易分析法の研究・開発が必要である。

1.3. 分散した微粒子による固相抽出を原理とした簡易分析法の着想に至った経緯

有機試薬やキレート試薬による呈色反応を利用した、簡易比色分析法として最も簡便な分析手法に spot test がある[45, 46]。spot test はろ紙や滴皿、スポイトを用いる方法から出発しているが、その応用範囲は極めて広く、定性分析の分野だけでなく半定量分析、定量分析の分野でも重要な役割を担ってきた。これらの手法は、予め、試薬を検出部に添加することで、採水操作だけの測定を可能とする。紙による検出や呈色した溶液による検出[47-50]、吸着剤を添加したカラムによる検出[51-54]など様々な分野で類似の手法が利用されている。しかし、操作が簡便ではあるが、試料によっては感度不足やマトリックスによる妨害を強く受ける。

Spot test の原理を用いて、呈色した試料溶液に PVC フィルムを添加し目的成分を吸着させるフィルム吸着比色法[55, 56]や目的成分特有の官能基を持つ高分子材料を試料に添加することで目的成分を分離し、高感度に測定する方法がある[57]。しかし、目的成分が吸着平衡に達するまでに時間を要する。高感度で選択性のある測定法を実現するためには、分離/濃縮操作が効果的な手法である。目的成分への親和性や高表面積を有する吸着剤は目的成分の効率的な吸着と濃縮を可能とする。これまでに、固相抽出や溶媒抽出のイオン液体や分散液液マイクロ抽出、エマルジョンなどによって微量成分の高濃縮が達成され高感度な測定法が報告されている[58-60]。

目視簡易分析法を環境水の計測に応用する場合、高感度化と試料水に含まれる着色成分と懸濁物質による妨害の克服が大きな課題である。簡易分析デバイスにろ過の仕組みを取り入れ、ペーパークロマト法などへの展開が考えられるが、簡便性と高感度化という、相反する要素を共存させる手段の構築は困難である。そこで本研究では、水相中に微細粒子を分散させることで効率的な濃縮ができることに着想を得て、反応容器内に吸着剤微粒子を均一分散させ、目的成分の呈色と同時に吸着・濃縮する方法を考案した。一つの容器内で、①目的成分の呈色反応、②着色成分の微粒子への吸着/濃縮、③微粒子の自重による分離が同時進行で起こり、微粒子の色調を目視や画像解析によってそのまま速やかに測定できる。この分離・濃縮手法を「分散微粒子抽出法」と名付けた。分散微粒子抽出法の特出すべき点は、水中に分散した吸着剤微粒子による目的成分の濃縮操作を組込んだことであ

る。分散微粒子抽出法による簡易分析システムを設計し、従来の比色法よりも迅速、簡便に高感度化を達成できる簡易比色分析法の開発に取り組むことに至った。

1.4. 分散微粒子抽出法の原理と操作

発色させた目的成分の迅速な吸着性と自然沈降性（あるいは浮上）を備えた微細粒子（吸着剤）による固相抽出を原理とする「分散微粒子抽出法」の原理と操作を Fig. 1.5.-1 に示す。呈色試薬（粉末）と吸着剤である微粒子を予め入れた容器に試料水（1 mL）を加え、目的成分の呈色と吸着剤による呈色成分の濃縮を同時かつ迅速に達成する。沈積した吸着剤の色調から目的物質の濃度を判定する。

これまで、試料溶液に呈色試薬を加え、目的成分を発色させた後、微粒子固相を加え、分散→分離・濃縮→回収→検出する分析法は既に報告されているが、本法のように、ひとつの容器内で、呈色→分離・濃縮→測定を完結するシステムは報告されていない。本法では、簡易分析法本来の迅速・簡便さを損なわずに、高感度化を果たすことができる。さらに、速やかに沈降・集積した粒子の色調から目的成分を定量するため、試料水に色が付いていても、沈降速度の遅い懸濁成分が含まれていても、妨害を受けにくいことが予想される。従って、本法は既存の簡易分析法の問題点を打破しうる革新的な方法となり得ると考えた。

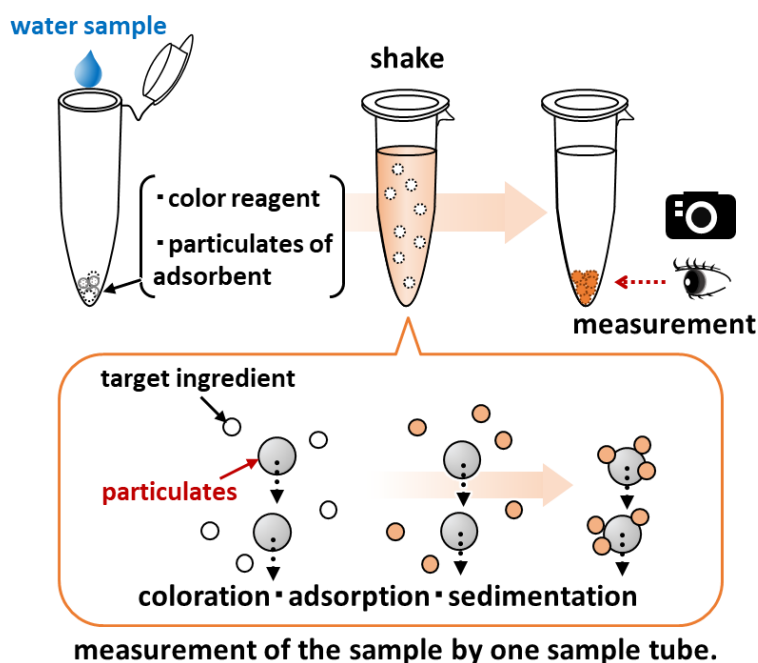


Fig. 1.5.-1 分散微粒子抽出法の原理と操作の概略

1.5. 本研究の目的

本論文では、現場分析の視点から簡易分析としての分析操作の簡便性と迅速性を損なわない、固相抽出に基づく新しい簡易分析システムの構築を目的とした。提案した分散微粒子抽出法を組込んだ簡易比色分析法を開発し、環境水中の微量成分 (Fe^{2+} , Ni^{2+} , NH_4^+ , NO_2^- , HCHO , PO_4^{3-} , Cr(VI) , Mn^{2+} , COD , CN^- , H_2O_2) を研究の対象成分とすることで、本法の有用性の立証と体系的な分析手法の確立を目指した。

第2章では、 NH_4^+ , Ni^{2+} , Fe^{2+} の簡易分析法を開発し、分散微粒子への単成分の吸着・捕集の仕組みの体系づけを目的とした。第3章では、 NO_2^- の簡易分析法を開発し、水相で目的成分の呈色反応が緩やかに進行する条件下で分散微粒子を共存させた場合の固相への吸着、着色の影響を確認することを目的とした。第4章では、 HCHO の簡易分析法を開発し、分散微粒子への複数成分の同時吸着・捕集の仕組みの体系づけを目的とした。第5章では、酵素法による PO_4^{3-} の簡易分析法を開発し、分散微粒子の粒径や添加量が本法の測定感度に与える影響を確認することを目的とした。第6章では、 Cr(VI) の簡易分析法を開発し、イオン対固相抽出の適用と抽出挙動の解明を目的とした。第7章では、 Mn^{2+} と COD の簡易分析法を開発し、 MnO_4^- の分散微粒子への捕集法を確立することで捕集原理を同じくする、分析項目の異なる測定法の開発を目的とした。第8章では、遊離シアン (CN^-)の簡易分析法を開発と沈積した微粒子層を再現よく撮影し現場分析に適した携帯型撮影ボックスを設計し、分散微粒子抽出法に適した測色法の確立を目的とした。第9章では、分散微粒子抽出法を蛍光測定法に応用し蛍光体の分散微粒子への抽出挙動を解明することで、目的成分の拡充と本法の更なる高感度化を目指した。

1.6. 参考文献

- [1] 小倉紀雄, *環境技術*, (1990), 9, 538. <https://doi.org/10.5956/jriet.19.538>
- [2] 小川清, 簡易計測器の活用による排水管理. *かんぎょう*, (2016), 7, 16-17.
- [3] 浦野紘平, 環境試料の簡易測定法の活用効果と現状及び今後, *ぶんせき*, (2006), 6, 255-259.
- [4] 澤本博道, 山本由美連, 身近な河川が子供たちの環境教育の教材.
- [5] 金子恵美子, 磯江準一, 水質分析キット. *ぶんせき*, (2002), 7, 360-365.
- [6] 小倉久子, *水環境学会誌*, (1993), 16, 600-605. <https://doi.org/10.2965/jswe.16.600>
- [7] Y. Kamegai, M. Nishigaki, *Japanese Geotechnical Journal*, (2014), 9, 387-395. <https://doi.org/10.3208/jgs.9.387>
- [8] 岡内完治, *環境技術*, (2003), 32, 49-54. <https://doi.org/10.5956/jriet.32.473>
- [9] 坂口武一, *分析化学*, (1966), 15, 187-193. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.15.187>
- [10] B. Walter, *Analytical Chemistry*, (1983), 55, 498A-514A. <https://doi.org/10.1021/ac00255a001>

- [11] Y. Tanaka, T. Nakamoto, T. Moriizumi, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2006), 119, 84–88.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.11.068>
- [12] M. E. Meyerhoff, B. Fu, E. Bakker, J.-H. Yun, V. C. Yang, *Analytical Chemistry Society*, (1996) 68, 168A-175A. <https://doi.org/10.1021/ac9618536>
- [13] C. F. Poole, *Journal of Chromatography A*, (2003), 1000, 963-984. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00435-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00435-7)
- [14] P. Bernard-savary, C. F. Poole, *Journal of Chromatography A*, (2015), 1421, 184-202.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.002>
- [15] H. Mizuguchi, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi, *Analyst*, (2000), 125, 1667-1671.
<https://doi.org/10.1039/b003522j>
- [16] H. Mizuguchi, H. Yasuda, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi, *Chemistry Letters*, (1997), 3, 895-896.
<https://doi.org/10.1246/cl.1997.895>
- [17] K. Ohzeki, Y. Satoh, Y. Kawamura, T. Kambara, *The Chemical Society of Japan*, (1983), 56, 2618-2626. <https://doi.org/10.1246/bcsj.56.2618>
- [18] F. Li, M. You, S. Li, J. Hu, C. Liu, Y. Gong, H. Yang, *Biotechnology Advances*, (2019), 107442.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107442>
- [19] Y. C. Yang, W. L. Tseng, *Analytical Chemistry*, (2016), 88, 5355-5362.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00668>
- [20] Y. Zhan, Y. Zeng, L. Li, F. Luo, B. Qiu, Z. Lin, L. Guo, *ACS Sensors*, (2019), 4, 1252-1260.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00125>
- [21] C. Radhakumary, K. Sreenivasan, *Analytical Chemistry*, (2011), 83, 2829-2833.
<https://doi.org/10.1021/ac1032879>
- [22] R. de la Rica, M. Stevens, *Nature Nanotechnology*, (2012), 7, 821-824.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2012.186>
- [23] Y. Yang, E. Noviana, M. P. Nguyen, B. J. Geiss, D. S. Dandy, C. S. Henry, *Analytical Chemistry*, (2017), 89, 71-91. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04581>
- [24] G. Gianini, T. Mazzu-nascimento, A. M. Stockton, E. Carrilho, *Analytica Chimica Acta*, (2017), 970, 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.037>
- [25] D. M. Cate, J. A. Adkins, J. Mettakoonpitak, C. S. Henry, *Analytical Chemistry*, (2015), 87, 19-41.
<https://doi.org/10.1021/ac503968p>
- [26] T. G. Silva, W. R. De Araujo, R. A. A. Mun, E. M. Richter, *Analytical Chemistry*, (2016), 88, 5145-5151. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00072>
- [27] D. Liu, J. Wang, L. Wu, Y. Huang, Y. Zhang, M. Zhu, Y. Wang, Z. Zhu, C. Yang, *Trends in Analytical Chemistry*, (2020), 122, 115701. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115701>
- [28] H. Mizuguchi, T. Yotsuyanagi, *Analytical Sciences/Supplements*, (2001), 17, i1687-i1689.
<https://doi.org/10.14891/analscisp.17icas.0.i1687.0>

- [29] H. Mizuguchi, H. Atsumi, K. Hashimoto, Y. Shimada, Y. Kudo, M. Endo, F. Yokota, J. Shida, T. Yotsuyanagi, *Analytica Chimica Acta*, (2004), 527, 131–138.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.09.080>
- [30] S. Kawakubo, A. Naito, A. Fujihara, M. Iwatsuki, *Analytical Sciences*, (2004), 20, 1159-1163.
<https://doi.org/10.2116/analsci.20.1159>
- [31] 村居景太, 本田宏子, 奥村浩, 岡内俊太郎, *分析化学*, (2019), 68, 465-472.
<https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.68.465>
- [32] 岡内完治, *だれでもできるパケットテストで環境しらべ*, (2000) 合同出版株式会社
- [33] C. Erger, T. C. Schmidt, *Analytical Chemistry*, (2014), 61, 74–82.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.05.006>
- [34] E. M. Thurman, M. S. Mills, *Solid-Phase Extraction : Principles and Practice. Chemical analysis* (1998), 147.
- [35] T. Okazaki, H. Kuramitz, N. Hata, T. Shigeru, K. Murai, K. Okauchi, *Analytical Methods*, (2015), 7, 2794-2799. <https://doi.org/10.1039/C4AY03021D>
- [36] 村居景太, 本多宏子, 奥村浩, 岡内完治, *分析化学*, (2011), 60, 507-514.
<https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.60.507>
- [37] H. Mizuguchi, R. Ishida, Y. Kouno, T. Tachibana, T. Honda, T. Kijima, Y. Yamamoto, T. Takayanagi, *Analytical Sciences*, (2018), 34, 907-912. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P093>
- [38] K. Yoshimoto, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi, *Chemistry Letters*, (2000), 29, 6-7.
<https://doi.org/10.1246/cl.2000.6>
- [39] J. shida, S. Umeki, *Analytical Sciences*, (1999), 15, 1033-1035.
<https://doi.org/10.2116/analsci.15.1033>
- [40] E. Kaneko, *Analytical Sciences*, (2004), 20, 247-254. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.247>
- [41] 田口茂, 関絵理子, 村居景太, 波多宣子, 倉光英樹, *分析化学*, (2006), 55, 525-529.
<https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.55.525>
- [42] H. Mizuguchi, Y. MaAtsuda, T. Mori, A. Uehara, Y. Ishikawa, *Analytical Sciences*, (2008), 24, 219-223. <https://doi.org/10.2116/analsci.24.219>
- [43] T. Okazaki, W. Wang, H. Kuramitz, N. Hata, S. Taguchi, *Analytical Sciences*, (2013), 29, 67–72.
<https://doi.org/10.2116/analsci.29.67>
- [44] M. R. Mohammad, M. Debapriyo, K. S. Mrinal, K. C. Uttam, L. Dilip, R. C. Chitta, R. Shibtosh, Md. R. Tofizur, C. Dipankar, *Environ. Sci. Technol.*, (2002), 36, 5385-5394.
<https://doi.org/10.1021/es020591o>
- [45] E. Jungreis, *Encycl. Anal. Chem.*, (2000). 15, <https://doi.org/10.1002/9780470027318.A8111>
- [46] M. T. Doménech-Carbó, *ChemTexts.*, (2022), 8, 1-66. <https://doi.org/10.1007/S40828-021-00152-Z/FIGURES/50>
- [47] L. C. Waters, R. W. Counts, A. Palausky, R. A. Jenkins, *J. Hazard. Mater.*, (1995), 43, 1-12.

- [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(95\)00022-M](https://doi.org/10.1016/0304-3894(95)00022-M)
- [48] S. Soares, M. J. A. Lima, F. R. P. Rocha, *Microchem. J.*, (2017), 133, 195-199.
<https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2017.03.029>
- [49] S. Soares, K. R. R. Campos, W. R. Melchert, F. R. P. Rocha, *Anal. Methods*, (2020), 12, 3918-3923.
<https://doi.org/10.1039/D0AY01013H>
- [50] S. Soares, K. G. Torres, E. L. Pimentel, P. B. Martelli, F.R.P. Rocha, *Talanta*, (2019), 195, 229-235.
<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.11.028>
- [51] Y. Kiso, K. Kuzawa, Y. Saito, T. Yamada, M. Nagai, Y. J. Jung, K. S. Min, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2002), 374, 1212-1217. <https://doi.org/10.1007/S00216-002-1644-9/METRICS>
- [52] S. Asaoka, Y. Kiso, T. Oguchi, Y. J. Jung, T. Yamada, Y. Saito, M. Nagai, *Talanta*, (2007), 72, 1100-1105. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2007.01.025>
- [53] Y. Kiso, Y. J. Jung, K. Kuzawa, Y. Seko, Y. Saito, T. Yamada, M. Nagai, *Chemosphere*, (2006), 64, 1949-1954. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.01.009>
- [54] K. Niki, Y. Kiso, T. Takeuchi, T. Hori, T. Oguchi, T. Yamada, M. Nagai, *Anal. Methods*, (2010), 2, 678-683. <https://doi.org/10.1039/B9AY00309F>
- [55] E. Kaneko, H. Tanno, T. Yotsuyanagi, *Mikrochim. Acta*, (1991), 103, 37-44.
<https://doi.org/10.1007/BF01245050/METRICS>
- [56] Chemical Education Journal, Vol.12, No.2, <http://www.edu.utsunomiya-u.ac.jp/chem/v12n2/yoshida/>
(Accessed December 22, 2022)
- [57] S. Kagaya, R. W. Catrall, S. D. Kolev, *Anal. Sci.*, (2011), 27, 653-653.
<https://doi.org/10.2116/ANALSCI.27.653>
- [58] S. Kagaya, S. Nakada, Y. Inoue, W. Kamichatani, H. Yanai, M. Saito, T. Yamamoto, Y. Takamura, K. Tohda, *Anal. Sci.*, (2010), 26, 515-518. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.26.515>
- [59] S. Kagaya, T. Yoshimori, *Anal. Methods*, (2012), 4, 4378-4383.
<https://doi.org/10.1039/C2AY25823D>
- [60] H. Naganawa, *分析化学*, (2017), 66, 797-808. <https://doi.org/10.2116/BUNSEKIKAGAKU.66.797>

第2章 分散微粒子抽出/比色分析法における吸着捕集の仕組み —アンモニア, ニッケル, 鉄(II)の分析法の開発—

2.1. はじめに

分散微粒子抽出/簡易比色分析法は大きく分けて、「呈色」、「吸着」、「沈降」、「測定」の4つの工程からなる分析方法である。その中でも重要なのが「吸着」である。微粒子の種類によって吸着挙動は大きく変化するためである。そこで、呈色成分の性質に対応した微粒子の選択と吸着の仕組み、そしてその応用について紹介する。

静電吸着を原理とする3つの事例を取り上げ、本法の吸着のモデルを説明する。

- (1)陰イオン成分（フェノール色素の吸着を利用したアンモニアの測定）
- (2)陽イオン成分の捕集（鉄(II)フェナントロリン錯体の吸着を利用した鉄(II)の測定）
- (3)吸着条件(pH)によって電荷が変化する成分の捕集（Ni(II)-PAR 錯体の吸着を利用した Ni(II)の測定）

また、微粒子への鉄(II)-フェナントロリン錯体の単成分吸着を用いた簡易分析法の開発から本法の特筆すべき性能と実用性を示す。

2.2. フェノール色素の吸着を利用したアンモニアの比色測定

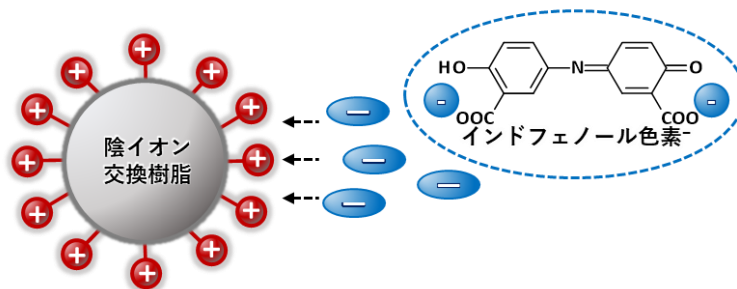
2.2.1. 目的成分を有色の陰イオンに変換して捕集する場合

目的成分を有色の陰イオン成分として捕集するモデルとして、汎用的な比色法であるインドフェノール青比色法を用いて $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を測定した。本法の分析フローと呈色成分の吸着の仕組みを Scheme 2.2.1.-1 に示す。 NH_4^+ にサリチル酸を反応させ、フェノール色素(青色または緑色)を生成させる。このフェノール色素は陰イオンとして存在するため、スチレンとジビニルベンゼンの微細孔構造をもつ共重合体に官能基（アミノ基）を修飾した陰イオン交換樹脂（DOWEX™ 1x8 (Cl⁻））へ静電吸着によって捕集した。本研究で確立した $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の比色測定について記す。

(A) アンモニアの分析反応



(B) 陰イオン交換樹脂による捕集モデル



Scheme 2.2.1.-1 (A) アンモニアの分析反応, (B) 陰イオンの微粒子への吸着モデル

2.2.2. 分析法の開発

2.2.2.1. 実験

2.2.2.1.1. 装置と試薬

紫外可視分光光度計 (島津製作所, UV-1800), ガラス電極式水素イオン濃度指示計 (HORIBA, D-51), 撮影ボックス HAD QT-310 (G・T・B・T)。カメラとして, デジタルカメラ: WG-5 GPS (Ricoh), DS 126441 (Canon), スマートフォンカメラ: iPhone 8 を使用した。測定した画像の解析には, Adobe Photoshop CC 2019 とフリーソフト ImageJ を用いた。塩化アンモニウム, サリチル酸ナトリウム, ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム, 水酸化ナトリウム, 水酸化リチウム (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。クロラミン T (Sigma Aldrich Co. LLC)。試薬は特級を使用し, 溶液は全て超純水を用いて調製した。吸着剤として, DOWEX™ 1x8 (Cl⁻) (粒径: 200~400 mesh) を使用した。各吸着剤は, 水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。

2.2.2.1.2. 実験操作

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ の比色測定操作を示す。

1.5 mL マイクロチューブに、1 mg のジクロロイソシアヌル酸ナトリウムを充填したところへ試料水 1 mL を加え、軽く振り混ぜた。更にそこへ、2 mg の水酸化リチウムと 5 mg のサリチル酸ナトリウムと 10 mg の DOWEX™ 1x8 (Cl^-) を加え、振り混ぜて 5 分間静置し、沈積した粒子の色調から $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の濃度を測定した。

2.2.2.2. 結果と考察

試料水 1 mL に対して微粒子を 10 mg 添加した結果の写真を Fig. 2.2.2.2.-1 (A) に示す。溶液の発色(a)と比較して、沈積した微粒子の色調変化(b)は低い濃度でも色調の判定が容易である。Fig. 2.2.2.2.-1 (B) に微粒子の色調変化(b)を画像解析法によって数値化した結果を示す。目視法では濃度の判定が非常に困難な低濃度 (0~0.6 mg/L) においても、4 種類のいずれの測定値においても 0~2.0 mg/L の範囲で直線を得ることができた。その中でも、Red の感度が最も高かった。画像解析法を用いることで、目視法では判定が困難な濃度範囲でも測定が可能になる。また、排水基準値 (100 mg/L) よりも極めて低濃度の測定も容易であった。

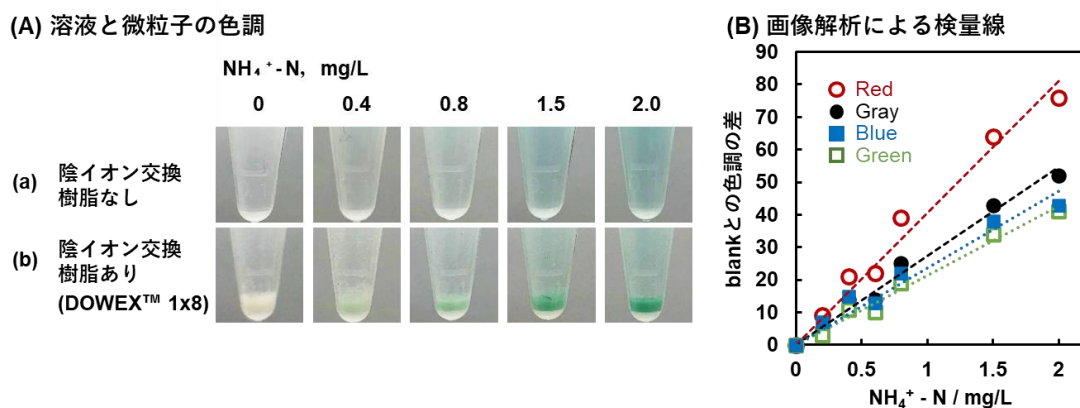


Fig. 2.2.2.2.-1 アンモニアの検量線

(A) 溶液と微粒子の比較写真 ((a) 溶液, (b) 微粒子), (B) 微粒子の色調 (Gray, RGB 値) とアンモニア濃度の関係

2.3. Ni(II)-PAR 錯体の吸着を利用したニッケルの比色測定

2.3.1. 条件によって電荷が変化する成分の捕集について

溶液の酸性度によって電荷が異なる，[Ni(II)-PAR] 錯体の捕集について説明する。Ni(II)を 4-(2-pyridylazo)resorcinol(PAR)と反応させ[Ni(II)-PAR]錯体（赤色）を生成させる。Fig. 2.3.1.-1 に示すように，[Ni(II)-PAR]錯体は水相の pH によって負電荷あるいは無電荷で存在する。陽イオン界面活性剤を修飾したシリカゲル（SiO₂）を作製して吸着剤として用いた(Scheme 2.3.1.-1 (A))。この吸着剤では，Scheme 2.3.1.-1 (B)に示すように陰イオンを捕集する場と中性成分を疎水性相互作用で捕集する場の 2 種類の捕集場が形成される。そのため，溶液中で電荷が変化しても捕集することができる。この吸着剤は SiO₂を陽イオン界面活性剤の溶液に浸漬するだけで容易に作製できる。

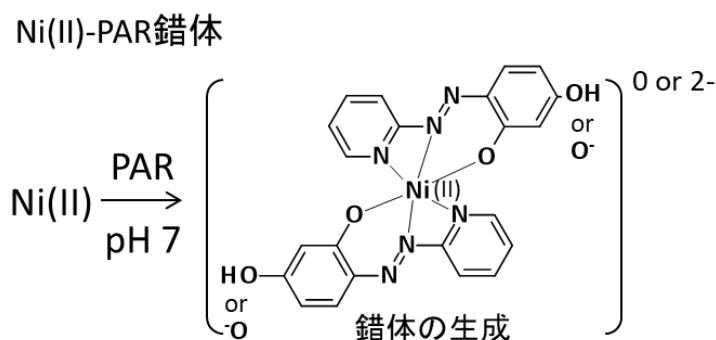
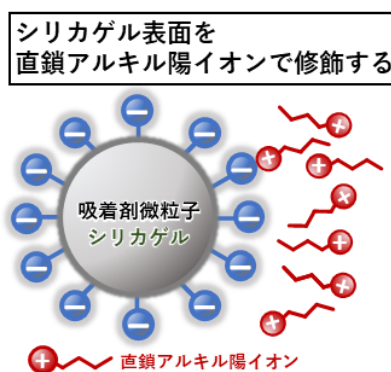
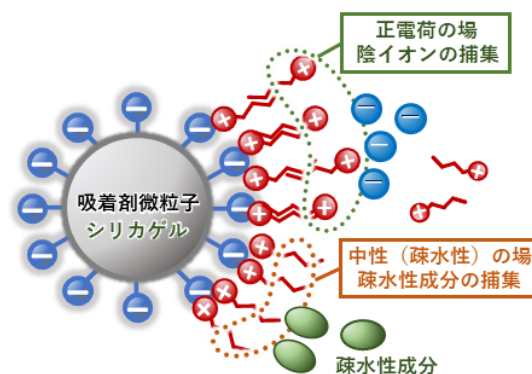


Fig. 2.3.1.-1 Ni(II)-PAR 錯体の構造と電荷の状態

(A) 界面活性剤修飾シリカゲルの作製



(B) 陰イオンと中性成分の吸着のモデル



Scheme 2.3.1.-1 界面活性剤を修飾したシリカゲル（SiO₂）による呈色成分の捕集

(A) 界面活性剤修飾 SiO₂ の作製，(B) 陰イオンと疎水性成分の微粒子への吸着モデル

2.3.2. 分析法の開発

2.3.2.1. 実験

2.3.2.1.1. 装置と試薬

2.2.2.1.1. 装置と試薬に実験に用いた装置及び画像解析ソフトを記載した。硝酸ニッケル六水和物, 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR), リン酸水素二ナトリウム, リン酸二水素カリウム, 塩酸, 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。試薬は, 特級を使用し, 全て超純水を用いて調製した。吸着剤として, Wakogel® C-300 (形状: 全多孔性破碎型, 粒径: 45~75 μm) を使用した。各吸着剤は, 水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。

2.2.2.1.2. 実験操作

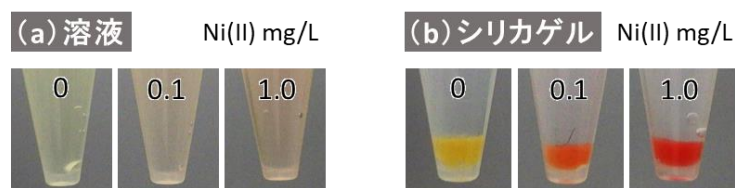
Ni(II)の比色測定操作を示す。

1.5 mL マイクロチューブに, PAR とリン酸緩衝液 (pH 7.0) と 10 mg の CTAB をコーティングした SiO_2 ($\text{SiO}_2(\text{CTAB})$) へ試料 1 mL を加え, 振り混ぜて 2 分間静置し, 沈積した粒子の色調から Ni(II)の濃度を測定した。

2.2.3.2. 結果と考察

試料溶液 1 mL に対して微粒子を 10 mg 添加して得られた Ni(II)の分析結果を Fig. 2.2.3.-1 に示した。 SiO_2 に [Ni(II)-PAR] 錯体を吸着・濃縮することで, 溶液では色変化の認識が困難な濃度でも検出が可能となった (Fig. 2.2.3.-1 (A))。この場合, 微粒子は吸着によって黄色から橙色そして赤色へと濃度によって色調が変化するために濃度の読み取りが非常に容易である。この色調変化は, 画像解析法の RGB 値の結果からも読み取ることができる (Fig. 2.2.3.-1 (B))。このように界面活性剤を修飾した SiO_2 を用いることで, 静電的な作用と疎水性相互作用を併用した, 目的成分の選択的な捕集をデザインすることができる。この手法は, 重金属の検出によく使われる試薬である PAN を用いて銅(II), 亜鉛(II), マンガン(II), カドミウム(II)などの分析法への応用が期待できる。

(A) 溶液と微粒子の色調



(B) 画像解析による微粒子の色調変化

Ni(II), mg/L	Red (blankとの差)	Green (blankとの差)	Blue (blankとの差)	色
0	246(0)	199(0)	84(0)	黄色
0.1	252(6)	172(27)	72(12)	橙色
1.0	235(11)	92(107)	67(17)	赤色

Fig. 2.2.3.-1 PAR を用いた Ni の分析

(A) 溶液と微粒子の写真 ((a) 溶液, (b) SiO₂)

(B) 画像解析による微粒子の色調変化 (RGB 値)

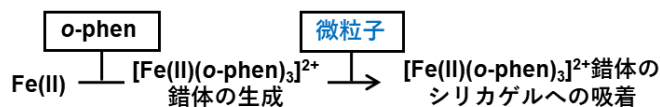
2.4. 鉄(II)-フェナントロリン錯体の吸着を利用した鉄(II)の簡易分析法の開発

上記では基本的な本法の吸着モデルを説明してきた。そこで、本法の体系付けとその結果得られた本法の特筆すべき点を鉄(II)-フェナントロリン錯体の微粒子への単成分吸着を用いた簡易分析法の開発で説明する。

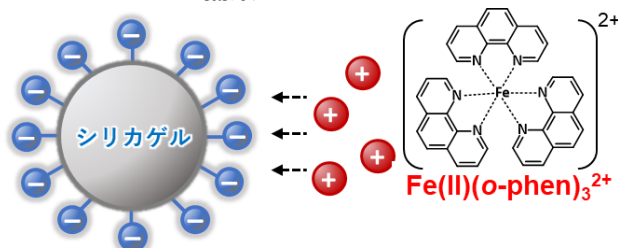
2.4.1. 目的成分を有色の陽イオンに変換して捕集する場合

本研究は、*o*-フェナントロリン吸光光度法を用いて鉄(II) (Fe²⁺) を測定した。本法の分析フローと呈色成分の吸着の仕組みを Scheme 2.4.1.-1 に示す。Fe²⁺を *o*-フェナントロリン塩酸塩 (*o*-phen) と反応させるとキレート錯体 [Fe(*o*-phen)₃]²⁺ (赤色) が生成する。[Fe(*o*-phen)₃]²⁺錯体は陽イオンであるため、水中で表面に負電荷を持つ SiO₂ へ静電吸着によって捕集された。

(A) 鉄(II)の分析反応



(B) シリカゲルによる捕集モデル



Scheme 2.4.1.-1 [Fe(o-phen)₃]²⁺の反応と吸着のモデル

(A) 鉄(II)の呈色反応, (B) 陽イオンの微粒子への吸着モデル

2.4.2. 鉄(II)について

鉄 (Iron, 化学式: Fe) は地球上の地殻で 4 番目に豊富な元素である[1]。植物や動物の生命に必要不可欠で、人体の微量必須元素である。私たちの体でも肺から体の細部に酸素を輸送するために使用するヘモグロビン分子の活性部分が鉄である。また、鉄金属は複数の商業的に利用され、他の金属や炭素と合金化されている。そのため、鉄は古くから人間に利用され、研究されている元素の 1 つである。鉄の酸化状態は、亜鉛族に属する第一鉄イオン (II⁺)、アンモニア族に属する第二鉄イオン (III⁺)、マンガン酸塩やクロム酸塩に類似している鉄酸塩 (VI⁺) に分かれている。その中でも二価の鉄は、Mn(II), Zn(II), Ni(II), Co(II)に似た性質を持つ。そのため、空気中では速やかに酸化され、白色の Fe(OH)₂ は pH 7.5 程度で沈殿しはじめる。環境中では様々な形態で存在し、2 価の正電荷を持つ Fe²⁺の形態ではほとんど存在していない。その代わりに 3 価の正電荷を持つ Fe³⁺の形態で存在している。Fe²⁺は、空気に触れると速やかに酸化し Fe³⁺に形態を変える[2]。そのため、Fe²⁺は地下水や湧水付近の上流のような還元的な環境中でしか存在はしていない。また、野外でサンプリングした場合、測定室へ運搬している間に形態が変化する恐れがある。正確な Fe²⁺濃度は現場で迅速に測定することが望ましい。

Fe²⁺の主な吸光光度定量法としては、チオシアン法、チフェロン法、ニトロソ R 塩法、および、オキシシ法など数多くの方法があり、フェロイン試薬の名で総称されている試薬を用いる方法が代表的である。なかでも、o-phen とバソフェナントロリンが最も鉄の定量に用いられている[3-7]。o-フェナントロリン吸光光度法は JIS K 0102:201662 に登録されている鉄の測定法である。この測定法で使用する o-phen は様々な金属イオンと反応し、水に可溶性錯体を生成するが、ほとんどの錯体は無色か極めて弱い呈色である。このうち

Fe²⁺の錯体は強い呈色を示す。[Fe(*o*-phen)₃]²⁺錯体は Scheme 2.4.1.-1 に示すように、1つのFe²⁺に3つのフェナントロリンを持つ構造をしており、2価の正電荷を持つ錯体である。そして、pH 2~9 で安定であり、濃度と吸光度の直線関係は 5.0 mg/L まで成立し、吸収極大は 510 nm (モル吸光係数 11000 L/mol·cm) にある。*o*-phen の選択性はバソフェナントロリン法よりもわずかに低い。しかし、バソフェナントロリンおよびその Fe²⁺錯化合物は水に不溶であるため、従来はイソアルミアルコールや *n*-ヘキサノールなどによる溶媒抽出法が用いられている。しかし、操作が煩雑であるため、*o*-phen を用いた測定法の方が簡便性は優れている。その簡便性を活かして、*o*-phen を用いた分析法は鉄の簡易分析法にも利用されており、試験紙やバックテスト®[8]などで使用されている。

2.4.3. 分析法の開発

2.4.3.1. 実験

2.4.3.1.1. 装置と試薬

紫外可視分光光度計 (島津製作所, UV-1800), デジタルバックテストマルチ SP(Kyoritsu Chemical-Check Lab, Corp. DPM-MTSP), ガラス電極式水素イオン濃度指示計 (HORIBA, D-51), 撮影ボックス HAD QT-310 (G・T・B・T)。カメラとして、デジタルカメラ: WG-5 GPS (Ricoh), DS 126441 (Canon), スマートフォンカメラ: iPhone 8 を使用した。撮影した画像の解析は、Adobe Photoshop CC 2019 とフリーソフト ImageJ を用いた。硫酸鉄(II)アンモニウム六水和物 (モール塩), *o*-フェナントロリン塩酸塩, 酢酸ナトリウム, 酢酸アンモニウム, リン酸水素二ナトリウム, リン酸二水素カリウム, 塩酸, 水酸化ナトリウム (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。試薬は、特級を使用し、全て超純水を用いて調製した。吸着剤として、Wakogel® C-300 (形状: 全多孔性破碎型, 粒径: 45~75 μm), Wakogel® C-200 (形状: 全多孔性破碎型, 粒径: 75~105 μm), Wakogel® 60N (形状: 全多孔性破碎型, 粒径: 63~232 μm), Wakosil® 75 (形状: 球状, 粒径: 45~105 μm), Wakogel® C-300HG (形状: 全多孔性破碎型, 粒径: 40~60 μm), Wakogel® C-400HG (形状: 全多孔性破碎型, 粒径: 20~40 μm), Wakogel® C-500HG (形状: 全多孔性破碎型, 粒径: 5~20 μm) を使用した。各吸着剤は、水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。

2.4.3.1.2. 確立した実験操作

Fe²⁺の最適化した簡易分析操作を示す。

1.5 mL マイクロチューブに、1 mg の *o*-phen と 7.3 mg の酢酸ナトリウムを粉碎混合した試薬と 10 mg のシリカゲル (Wakogel® C-300) を充填した。そこへ試料 1 mL を加え、振り混ぜた後、30 秒間静置し、沈積した粒子の色調から Fe²⁺の濃度を測定した。

2.4.3.1.3. 画像測色法

目視法[9-11]では測定者によって分析精度が異なるため、デジタルカメラや携帯カメラを用いて撮影した画像を用いた分析法[12-15]を用いた。これは、撮影した画像をパソコンに取り込み、画像処理ソフトで画像上のそれぞれの色情報を数値化 (Gray 値, RGB, Lab, CMYK) する方法である。この方法は、大掛かりな機材を必要とせず、一般に普及しているカメラや携帯、ノートパソコンで測定と解析ができるため極めて安価で簡便である。そこで本法を画像解析で測定した。

スマートフォンのカメラ機能でマイクロチューブを撮影した。背景を黒にして、吊るして撮影した。写真をパソコンに転送し、Adobe Photoshop CC 2019 のソフトウェアを使用して 8bit のグレースケールに変換した。マイクロチューブ内に沈積した微粒子を拡大し、縦方向に 10 箇所スポイトツールを使って Gray 値を測定した。測定した 10 箇所を平均化して Gray 値を求めた。

2.4.4. 結果と考察

2.4.4.1. 吸着剤微粒子の選択

本法では、[Fe(*o*-phen)₃]²⁺錯体が SiO₂ 表面に静電吸着によって吸着・捕集される。そこでまず、SiO₂ の粒径や形状を変え最適な吸着剤微粒子を選択した。[Fe(*o*-phen)₃]²⁺錯体は JIS K 0102 : 2016 鉄の吸光光度法[16]に則り、酢酸・酢酸アンモニウム溶液 (pH 4) を緩衝剤として用いた。粒径の異なる 8 種類の SiO₂ は C-200 (75~105 μm), C-300 (45~75 μm), 60N (63~232 μm), 75 (45~105 μm), C-300HG (40~60 μm), C-400HG (20~40 μm), C-500HG (5~20 μm) を用いて検討した。それぞれの吸着等温線 (Fig. 2.4.4.1.-1) を作成し、Henry の式 (W/m=KC) と定義し吸着定数 (K) を算出した結果を Fig. 3.7.1-2 に示す。この結果から、吸着定数は粒径が小さいほうが大きくなった。粒径の構成が 75 μm 以上 (C-200) では吸着定数が、明らかに小さくなることが分かった。しか

し、粒径が小さくなると沈降速度が遅くなる。そこで、降速度が適当で粒径が一定な Wakogel® C-300 (45~75 μm) を選択した。

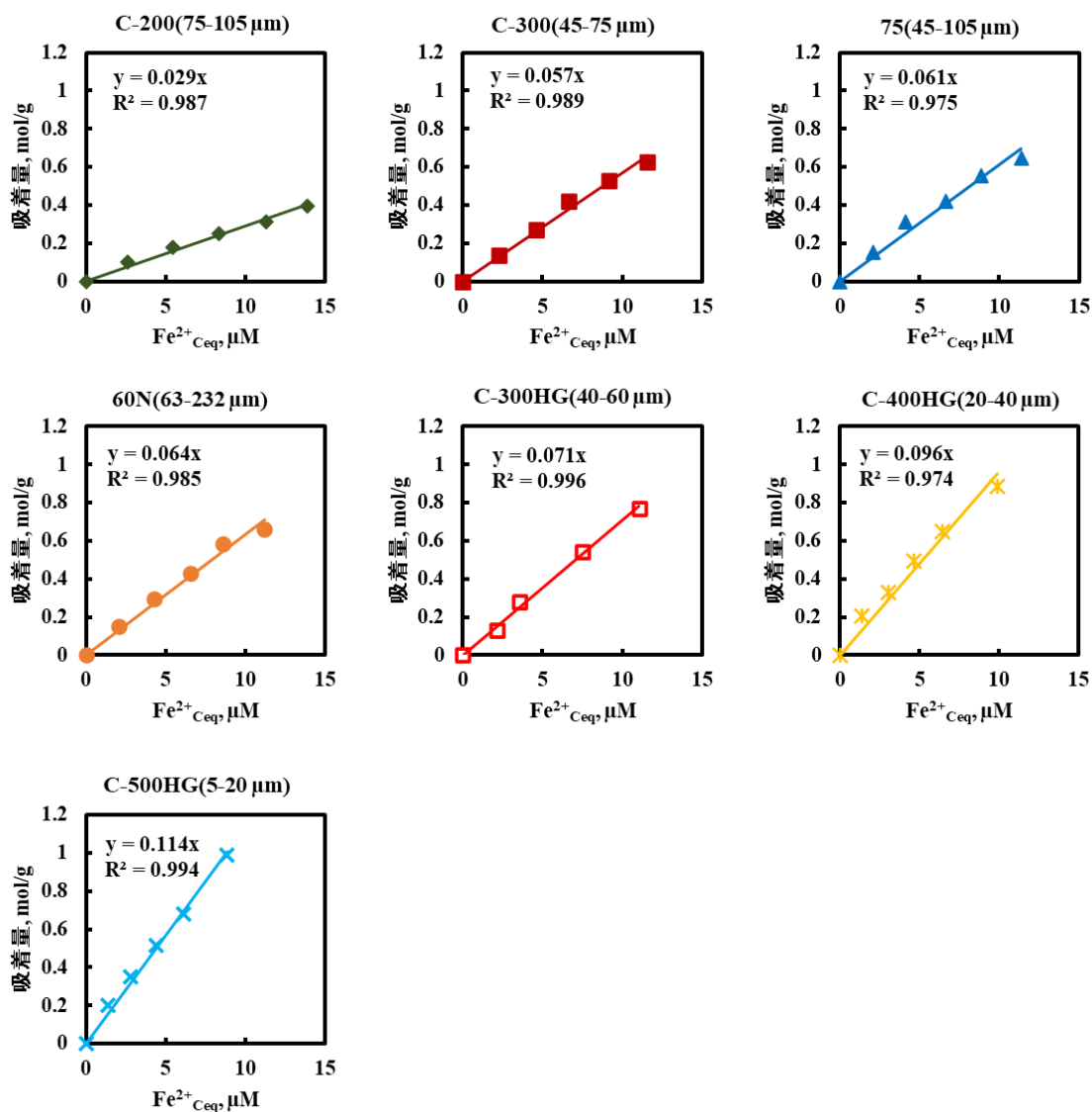


Fig. 2.4.4.1.-1 粒径の異なる SiO₂ ごとの吸着等温線

吸着条件；試料量：1 mL，微粒子量：10 mg ((◆) C-200(75~105 μm)，(■) C-300(45~75 μm)，(▲) 60N(63~232 μm)，(●) 75(45~105 μm)，(□) C-300HG(40~60 μm)，(*) C-400HG(20~40 μm)，(×) C-500HG(5~20 μm))

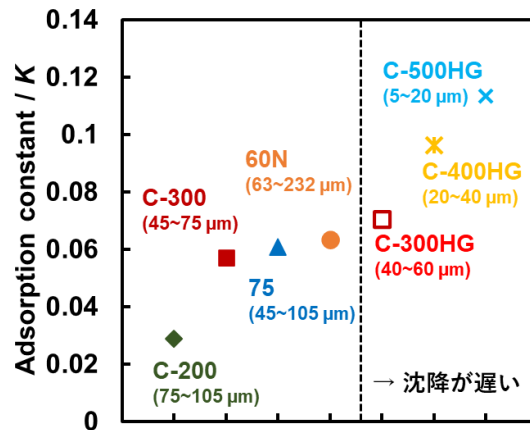


Fig. 3.7.1-2 粒径の異なる SiO₂ ごとの吸着定数の比較

吸着条件；試料量：1 mL，微粒子量：10 mg ((◆) C-200(75~105 μm)，(■) C-300(45~75 μm)，(▲) 60N(63~232 μm)，(●) 75(45~105 μm)，(□) C-300HG(40~60 μm)，(*) C-400HG(20~40 μm)，(×) C-500HG(5~20 μm))

2.4.4.2. 緩衝剤の検討

試料量 1 mL に対して，10 mg の C-300 で $[\text{Fe}(\text{o-phen})_3]^{2+}$ 錯体の捕集率は 35% と低いため，捕集率の向上を試みた。まず，酢酸・酢酸アンモニウム緩衝剤の添加量 (0 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.4 mL) を変えて捕集率を比較した (Fe^{2+} : 1 mg/L) (Fig. 2.4.4.2.-1)。その結果，緩衝剤の増加とともに捕集率が減少した。溶液の pH は一定であるため，捕集率の減少は緩衝剤の成分によるものであると考えられる。SiO₂ の表面は水中で負電荷を有し正電荷のイオンを吸着する。酢酸アンモニウムに含有する NH_4^+ は $[\text{Fe}(\text{o-phen})_3]^{2+}$ 錯体と同様に正電荷であるため吸着競合がおき，SiO₂ への捕集が低下したと考えられる。そこで， NH_4^+ を含まない緩衝剤としてフタル酸水素カリウム，酢酸ナトリウムを用いて検討した。また， $[\text{Fe}(\text{o-phen})_3]^{2+}$ 錯体は pH が 2~9 の間で安定的に生成することが知られており，SiO₂ 表面電荷は水相の pH で変化するため [17]，pH を変えて最適条件を検討した (Fig. 2.4.4.2.-2)。この結果から，緩衝剤を添加なしと緩衝剤にフタル酸水素カリウム，酢酸ナトリウムを用いた 3 種類ともに，pH の変動によって捕集率が変化した。緩衝剤を添加しない場合は pH 5，酢酸ナトリウムを用いた場合は pH 7 で捕集率が 90% で一定になった。フタル酸水素カリウムでは pH 2 から 9 で捕集率は上がり続けていた。 $[\text{Fe}(\text{o-phen})_3]^{2+}$ 錯体はフタル酸水素カリウムと構造が似ているサリチル酸の抽出に用いられるため SiO₂ への捕集率に影響を与えるのではないかと考えられる [18, 19]。 $[\text{Fe}(\text{o-phen})_3]^{2+}$ 錯体の SiO₂ への吸着には共存イオンのイオン強度や競合，pH の影響を受けるためそれを考慮し，緩衝剤を 0.09 M 酢酸ナトリウム (pH 7) とした。これより，捕集率が 90% 以上に向上した。

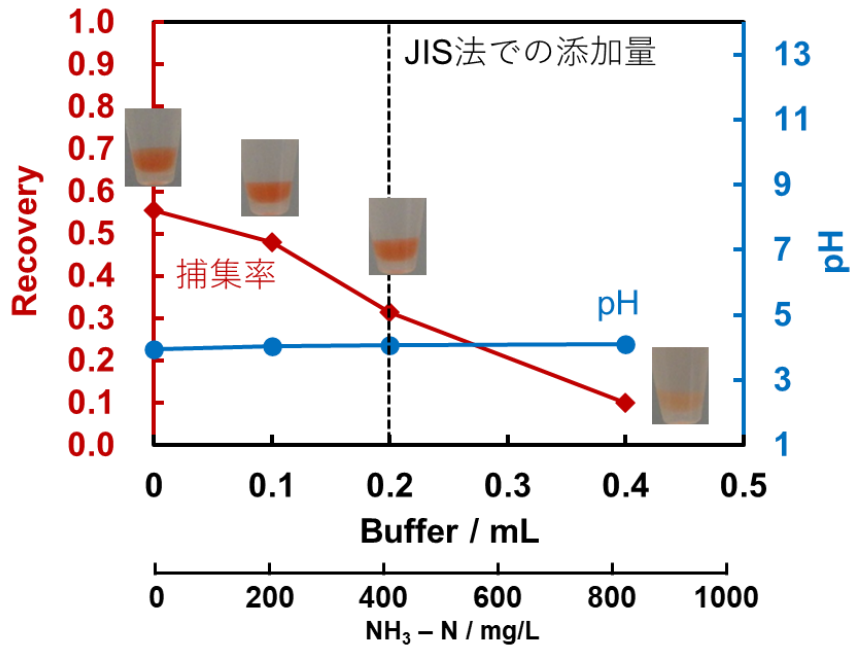


Fig. 2.4.4.2.-1 緩衝剤（アンモニウムイオン）の吸着妨害（赤線：捕集率，青線：pH）

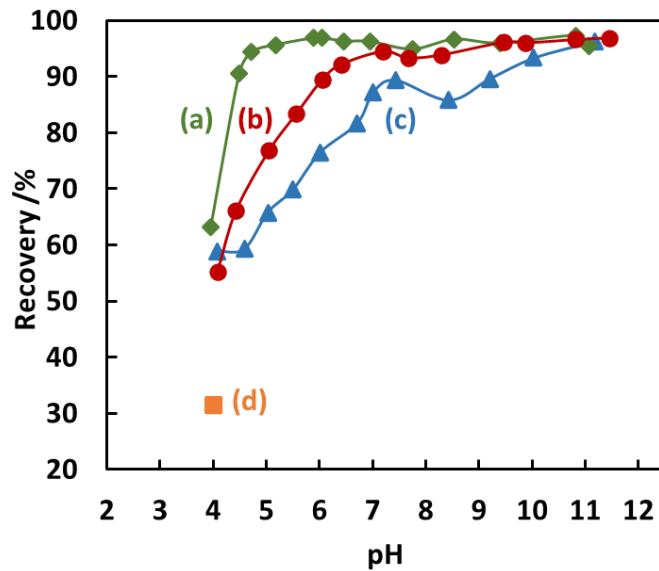


Fig. 2.4.4.2.-2 $[\text{Fe}(\text{o-phen})_3]^{2+}$ の捕集率に対する緩衝剤と pH の影響
 吸着条件；試料量：1 mL，緩衝液濃度：0.09 mol/L ((a) 緩衝剤なし，(b) 酢酸ナトリウム，(c) フタル酸水素カリウム，(d) 酢酸アンモニウム)

2.4.4.3. 微粒子の沈降速度と呈色速度

現場での使用を目的とした簡易分析法では、測定の迅速さは重要である。本法の測定時間の検討をした。分散微粒子抽出法において測定の迅速性を決める要因は、目的物質が発色する速度と SiO₂ 粒子への吸着平衡速度、SiO₂ 粒子の自然沈降の速度である。目的物質の発色は各呈色反応に依存するため、今回は SiO₂ 粒子への吸着平衡速度と粒子の自然沈降速度を測定した。

混合粉末試薬と SiO₂ 10 mg を予め加えた 1.5 mL マイクロチューブへ 0.6 mg/L の Fe²⁺ 溶液 1 mL を添加し、振り混ぜて静置した様子 (Fig. 2.4.4.3.-1 (A)) と沈積した SiO₂ の Gray 値を静置時間ごとに示した (Fig. 2.4.4.3.-1 (B))。Fig. 2.4.4.3.-1 (A) より、時間の経過とともに SiO₂ が底へ沈積し、30 秒後と 40 秒後の SiO₂ の沈積量が同じであることから自然沈降は 30 秒で完了したことが分かった。また、Fig. 2.4.4.3.-1 (B) より、10 秒以降の SiO₂ の Gray 値が一定であることから、10 秒以内に呈色成分の SiO₂ 粒子への吸着が平衡に達したと考えられる。そのため本法は、静置してから 10 秒程度で Fe²⁺ の検出が可能である。

本法は、発色、吸着、分離そして目視で測定するという全てのステップが 30 秒以内に行えるため、迅速な測定法であるといえる。

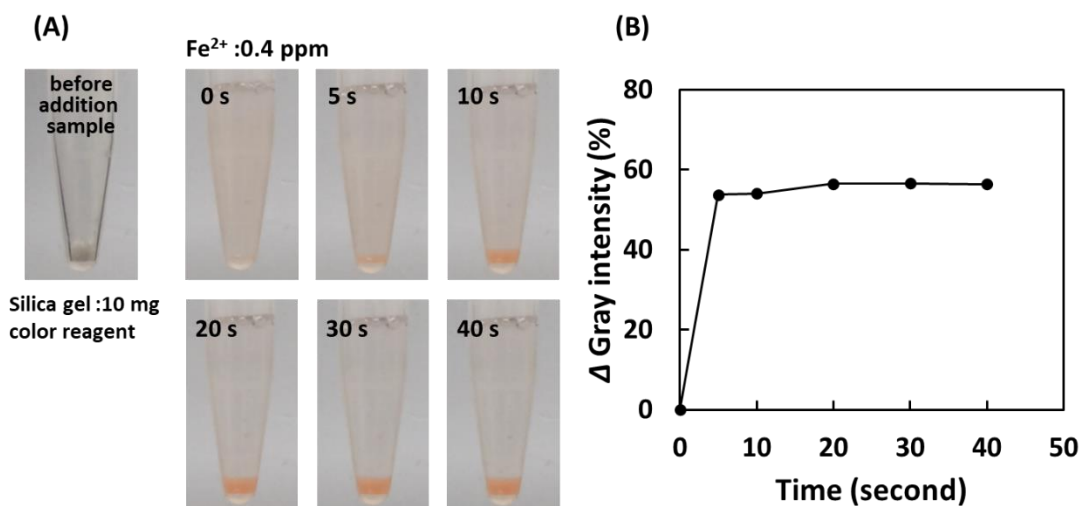


Fig. 2.4.4.3.-1 時間経過ごとの微粒子の沈降の様子

(A) 時間ごとの沈降の様子 (Fe²⁺ : 0.4 mg/L, SiO₂ : 10 mg), (B) 微粒子の Gray 値の経時変化

2.4.4.4. 定量範囲

Fig. 2.4.4.4.-1 は, $[\text{Fe}(o\text{-phen})_3]^{2+}$ 錯体 (Fe^{2+} , 0~0.1 mg/L) を含む 1 mL の試料水に 10 mg の SiO_2 の存在下, 非存在下でのマイクロチューブの写真を示した。Fig. 2.4.4.4.-1 (A)および(B)の写真から得られた Gray 値は, 溶液の目視比色分析法よりも約 10 倍感度が高かった。この条件では, Fe^{2+} は 0.2 mg/L 間隔で 0.2~0.6 mg/L の範囲を目視で測定できた (Fig. 2.4.4.4.-1 (B))。画像解析から得られた検量線を示す。Fig. 2.4.4.4.-1 (C)は, Gray 値と Fe^{2+} 濃度の関係を $y = 57.8x - 27.5x^2$ ($n=10$), $R^2 = 0.998$ であった。ここで, y は Gray 値, x は Fe^{2+} の濃度である。算出した検出限界 (LOD) は 0.03 mg/L ($3\sigma_B$)であった。分光光度法による $o\text{-phen}$ 法の定量範囲, 0.05~1 mg/L (光路長 1 cm) と本法を比較すると, 本法は 1 mL の試料量で十分な感度が得られた[20, 21]。さらに, 本法は, WHO が設定した飲料水基準を十分測定できる感度を持つ[22]。

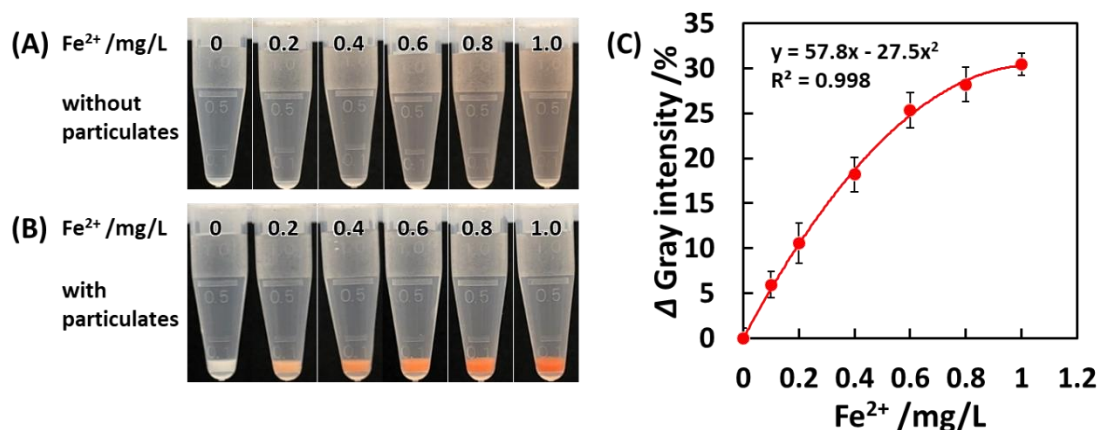


Fig. 2.4.4.4.-1 異なる Fe^{2+} 濃度での溶液と微粒子の色変化

(A) 微粒子なし, (B) 微粒子あり, (C) Fe^{2+} 濃度と沈積した微粒子の Gray 値の関係

2.4.4.5. 共存成分と有色成分の影響

環境水には様々な共存成分があり, なかでも有色成分の夾雑物は呈色反応の検出を阻害する。そのため, ろ過などの前処理が必要であり, ろ過をしても色が残っている場合は, 市販の簡易分析キットでは測定が困難である。分散微粒子抽出法は, 微粒子の選択性を活かして有色成分共存下でも測定ができるか検討した。

自然界に多く存在する, 有色物質としてフミン酸を用いた。0.5 mg/L の Fe^{2+} へ 100 mg/L のフミン酸を添加し測定した結果を Fig. 2.4.4.5.-1 に示す。フミン酸共存下では

[Fe(*o*-phen)₃]²⁺錯体の色を目視で判定することが困難である (Fig. 2.4.4.5.-1 (A)) が、本法ではフミン酸の影響を受けずに Fe²⁺を目視で測定できた (Fig. 2.4.4.5.-1 (B))。SiO₂ の表面は負に帯電し、負電荷をもつフミン酸はほとんど吸着されないため、SiO₂ に[Fe(*o*-phen)₃]²⁺錯体のみが吸着し水相 (フミン酸) と固相 ([Fe(*o*-phen)₃]²⁺錯体) で分離が起き、フミン酸が共存している状態でも測定ができた。本法は、微粒子の選択性を活かすことで目的成分を有色成分除去の前処理なしに有色成分共存下でも測定ができると考えられる。また、無機成分を用いて 0.6 mg/L の Fe²⁺の測定精度に対する影響を調べた (Table 2.4.4.5.-1)。環境水中に存在する濃度レベル(>約 1.0 mg/L)の銅、亜鉛、ニッケルなどの主要成分および重金属は、本法の Fe²⁺の測定に影響を与えないことがわかった。

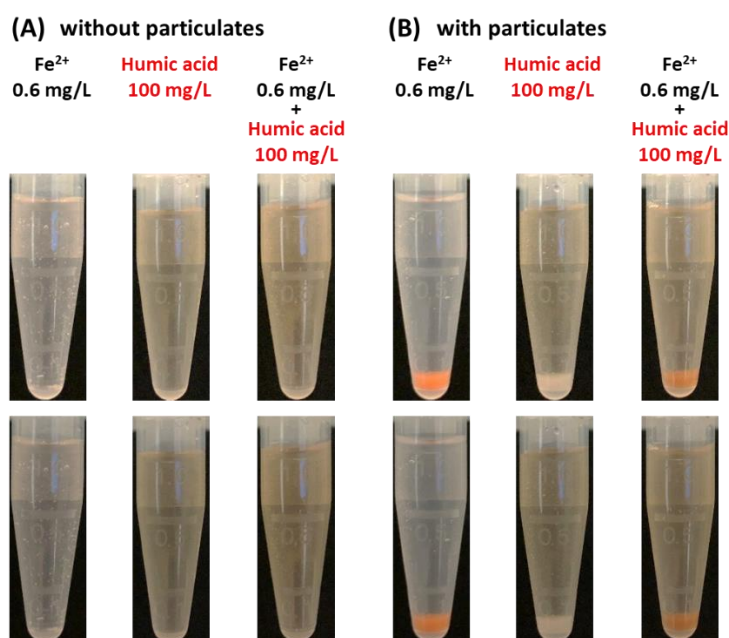


Fig. 2.4.4.5.-1 フミン酸 (100 mg/L) の存在下での Fe²⁺ (0.6 mg/L) の測定
(A) 微粒子なし, (B) 粒子あり

Table 2.4.4.5.-1 Gray 値に対する無機成分の影響 (Fe²⁺ : 0.6 mg/L)

Ion	Added as	Conc. mg/L	Gray /%	RSD /%
None	-	-	14.1	2.4
Cu ²⁺	CuSO ₄ 5H ₂ O	2	16.0	2.4
Co ²⁺	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.6	13.8	2.2
Cd ²⁺	Cd(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0.1	8.9	3.2
Ni ²⁺	Ni(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	1.2	10.8	1.7
Zn ²⁺	Zn(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	10	10.3	2.8
Pb ²⁺	Pb(NO ₃) ₂	10	9.3	4.1
K ⁺	KCl	100	10.5	0.5
Ca ²⁺	CaCl ₂ H ₂ O	100	6.9	2.7
Mg ²⁺	MgSO ₄ 7H ₂ O	1215	12.0	3.1
SO ₄ ²⁻	MgSO ₄ 7H ₂ O	4800	12.0	3.1
Na ⁺	NaCl	0.5 M	12.4	2.4
Cl ⁻	NaCl	0.5 M	12.4	2.4

n=3

2.4.5. 実試料への応用

2.4.5.1. 環境水への応用

本法を富山市内の消雪水及び富山県の立山を流れる河川水へ応用した。

富山県富山市四方海岸付近の道路は富山大学周辺の道路と比べ赤く染まっている。富山県の消雪水に利用している水は地下水であることが多く、地下水は、還元的な雰囲気であるため鉄が Fe²⁺の状態が存在している[2]。Fig. 2.4.5.1.-1 より消雪機付近の雪が赤く染まっていることから、四方海岸で使われる消雪水には Fe²⁺が多く含まれていると考えられるため測定の対象とした。サンプリング日時、測定時間、pH、EC を Table. 2.4.5.1.-1 に示す。各地点の消雪水は実験室に持ち帰ってから測定した。それぞれの測定結果を Fig. 2.4.5.1.-2 に示す。その結果、大学前道路は、Fe²⁺が検出されなかった。四方海岸の試料はサンプリングから 30 分後の測定の結果、SiO₂ への色が極めて濃く、SiO₂ 10 mg の捕集能を超える Fe²⁺の濃度であった。JIS K 0102 : 2016 鉄の吸光光度法[16]を用いて四方の消雪水を測定した結果、5.4 mg/L であり、この値は還元剤を添加し測定した値 (Fe_{total}) と一致した。四方の消雪水中のサンプリング直後の鉄イオンはほとんどが Fe²⁺で構成されているといえる。しかし、サンプリングから 5 時間後と 24 時間後に再度測定すると、5 時間後では目視判定で約 0.1 mg/L となり、24 時間後では Fe²⁺は検出されず、Fe²⁺が明らかに減少した。従って本法では Fe²⁺はサンプリング直後からの Fe²⁺の形態の経時変化を測定できた

ということになる。

富山県立山町を流れる称名川（称名滝）でサンプリングをした。称名川は火山活動が活発な地獄谷（立山）を通った水が流入するため、水質に強く影響を受けている[24]。そのため、地獄谷から多くの重金属が流入している。また、称名川の上流では pH は低くなり、下流に向かって他の河川水の流入で pH は高くなる。上流と下流で水質条件が異なる河川である称名川で、Fe の形態がどのように変化するかを調べた。上流 2 地点と下流 1 地点で測定した。サンプリング地点を Fig. 2.4.5.1.-3 に示し、各地点の測定結果を Table. 2.4.5.1.-2 に示した。本法は現場で測定した。目視法と吸光光度法（現場で測定したデジタルパックテストの結果）を比較したところ値がよく一致した。上流では Fe^{2+} 濃度が高く、称名滝から離れるにしたがって（下流） Fe^{2+} 濃度は減少した。pH は上流では 4 程度であるが下流では 6 程度まで上昇したため Fe(III) に酸化した。このことから、称名滝では上流から下流にかけて次第に Fe^{2+} は 3 価の水酸化物に変化し、減少したと考えられる。このように Fe^{2+} は空気中では直ちに Fe^{3+} の状態へ変化するため、環境水中の Fe^{2+} を測定する際は、サンプリングを行ってから研究室へ運び測定を行う頃には形態が変化している可能性が高い。そのため、このような形態の変化しやすい物質の測定には現場分析が必要であり、現場分析が可能である本法は適している。

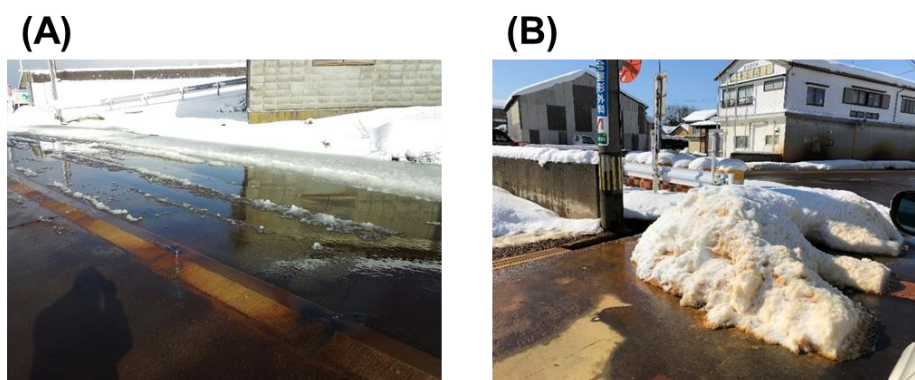


Fig. 2.4.5.1.-1 サンプリング地点の様子：富山県四方海岸，道路
(A) 消雪水の流れる様子，(B) 消雪水が触れ赤く染まった雪の様子

Table. 2.4.5.1.-1 採水地点ごとの採水時間，pH，EC

採水地点	大学前道路	四方海岸
採水日	2018.1.24	2018.1.24
pH	7.20	7.28
EC	0.19 mS/m	3.93 S/m





(a)		(b)			
大学前道路		四方海岸			
採水からの測定までの時間	30 min	採水からの測定までの時間	30 min	5 hour	24 hour
This method / mg/L	N.D.	This method / mg/L	(Fe _T =Fe ²⁺ 5.4 ppm) 0.1		N.D.

Fig. 2.4.5.1.-2 大学前道路及び四方海岸の採水時間ごとの結果

(a) 大学前道路, (b) 四方海岸 (消雪水)

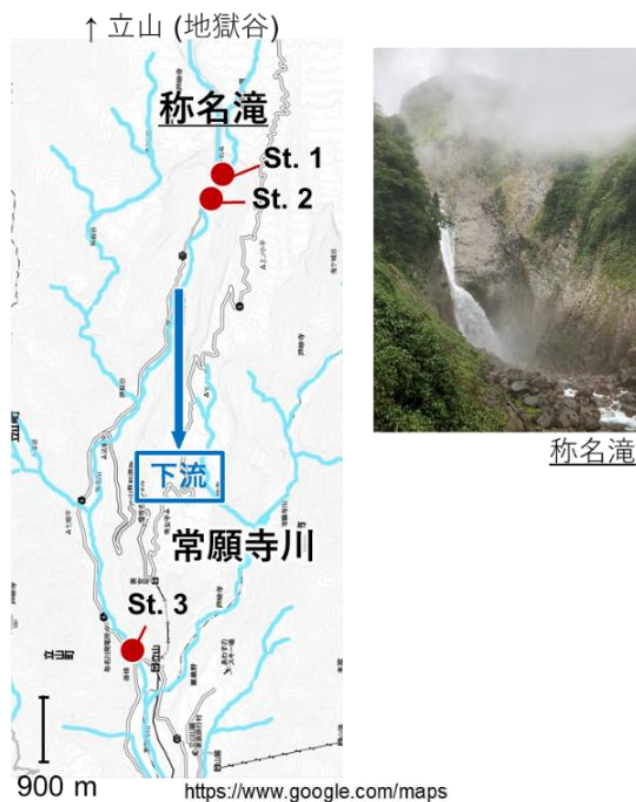


Fig. 2.4.5.1.-3 富山県立山町称名川でのサンプリング地点

Table. 2.4.5.1.-2 河川水中の Fe²⁺ 濃度

River water	pH	This method / mg/L	Spectrophotometry / mg/L
upstream 1	4.16	0.4	0.4
upstream 2	4.58	0.4	0.3
downstream	6.23	<0.2	0.1

2.5. まとめ

微粒子の分散と吸着に着目し、微粒子として SiO₂、測定物質として Fe²⁺を *o*-phen と反応させた [Fe(*o*-phen)₃]²⁺錯体を選択し、Fe²⁺の高感度目視分析法の開発を行った。呈色した目的物質を自然沈降する SiO₂ へ吸着させ底へ集まった SiO₂ を目視で測定するという分析法を提案した。この分析法は、操作が非常に簡便で迅速であり、溶液中の色を集めるため低濃度でも検出ができ、微粒子への選択的な吸着を利用しているため有色の夾雑物の存在下でも測定ができる。本法は、pH 7 以上で [Fe(*o*-phen)₃]²⁺錯体を 90%以上の捕集率で吸着させることができ、pH 調整剤を酢酸ナトリウムとした。粉末試薬を予め容器の中へ入れておくことにより、発色（錯体形成）、吸着・濃縮、微粒子の分離の3つのステップが1つにまとまり、本法の測定は30秒以内に完了する。また、サンプル量は1 mL とごく少量で測定可能である。そして、SiO₂の色がFe²⁺濃度に比例し、SiO₂添加なしに比べ10倍程度の感度が上昇した。分散微粒子抽出法は、微粒子へ呈色した目的成分を吸着させ、底へ集め測定するというシンプルな方法であるため実用的で汎用性に富む分析法である。

2.6. 参考文献

- [1] Iron Facts, Thought Co, <https://www.thoughtco.com/iron-facts-606548> (Accessed 2021)
- [2] 今泉 洋, 上田 一正, 澤田 清, 田口 茂, 永長 幸雄, 長谷川 淳, 本浄 高治, 山田 明文, 基礎分析化学, (2015)
- [3] S. Nigo, K. Yoshimura, T. Tarutani, *Talanta*, (1981), 28, 689.
- [4] K. Yoshimura, H. Waki, *Talanta*, (1985), 32, 345-352. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(85\)80097-7](https://doi.org/10.1016/0039-9140(85)80097-7)
- [5] 那須 義和, 多賀 光彦, 川村 静夫, 都築 俊文, 田村 紘基, 田中 俊逸, 水の分析, (第4版) (2003)
- [6] Camilo de L. M. de Moraes, Sérgio R. B. Silva, Davi S. Vieira, and Kássio M. G. Lima, *J. Chem. Educ.*, (2016), 93, 1760-1765. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00112>
- [7] W. B. Fortune and M. G. Mellon, *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, (1938), 10, 60-64. <https://doi.org/10.1021/ac50118a004>
- [8] 岡内 完治, パックテストで環境しらべ (新版第8版), 合同出版
- [9] Selma L. Bandemer, P J. Schaible, *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, (1944), 16, 317-319. <https://doi.org/10.1021/i560129a013>
- [10] M. Varona, X. Ding, K. D. Clark, J. L. Anderson, *Analytical Chemistry*, (2018), 90, 6922-6928. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01160>
- [11] Y. Zhan, Y. Zeng, L. Li, F. Luo, B. Qiu, Z. Lin, L. Guo, *ACS Sensors*, (2019), 4, 1252-1260. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00125>
- [12] 間中 淳, 五十嵐 淑朗, 化学と教育, (2016), 64, 20-21. https://doi.org/10.20665/kakyoshi.64.1_20

- [13] N. A. Vázquez-Mera, J. R. Otaegui, R. S. Sánchez, G. Prats, G. Guirado, D. Ruiz-Molina, C. Roscini, J. Hernando, *ACS Applied Materials and Interfaces*, (2019), 11, 17751-17758. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b02169>
- [14] E. Hirayama, T. Sugiyama, H. Hisamoto, K. Suzuki, *Analytical Chemistry*, (2000), 72, 465-474. <https://doi.org/10.1021/ac990588w>
- [15] 甲斐 穂高, 越後 亜美, 岡 芳樹, 黒田 大介, 柴田 慶之, 間中 淳, *工業教育*, (2018), 66, 52-60. https://doi.org/10.4307/jsee.66.4_52
- [16] A. Manaka, Y. Yokota, T. Nakamura, S. Furuyama, M. Tafu, M. Irie, *Journal of Arid Land Studies*, (2017), 58, 55-58. https://doi.org/10.14976/jals.27.1_55
- [17] JIS K 0101, (1998)
- [18] E. M. Thurman, M. S. Mills, *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. Chemical analysis, (1998)
- [19] 山本 勇麓, 熊丸 尚宏, 林 康久, 大槌 光枝, *分析化学*, (1969), 18, 354-359. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.18.354>
- [20] 山本 勇麓, 熊丸 尚宏, 坪内 正弘, 沖村 一三, *分析化学*, (1967), 16, 937-941. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.16.937>
- [21] F.W. Gilcreas, *Am. J. Public Health Nations. Health*, (1966), 56, 387-388. <https://doi.org/10.2105/ajph.56.3.387>
- [22] J. Shida, I. Masuda, *Anal. Sci.*, (1998), 14, 333-336. <https://doi.org/10.2116/analsci.14.333>
- [23] WHO, Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first and second addenda, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240045064> (Accessed 2022)
- [24] 朴木 栄治, 富山市科学博物館研究報告, (2019), 43, 35-46.

第3章 亜硝酸の簡易分析法

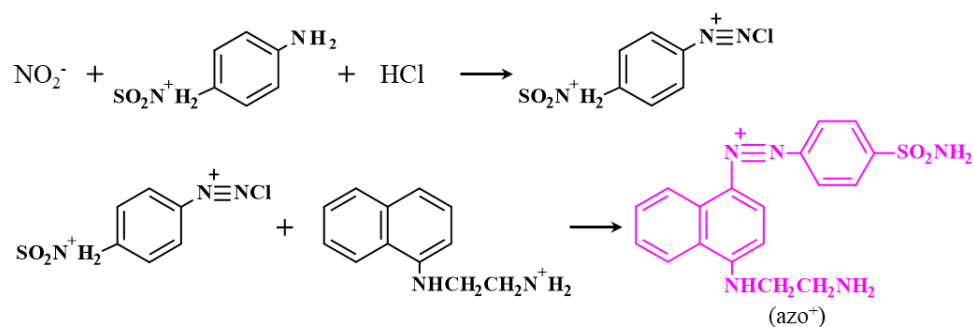
—微粒子が与える呈色反応速度への影響—

3.1. はじめに

亜硝酸と反応して生成するアゾ色素は呈色が安定するまでに時間がかかる。亜硝酸呈色時に微粒子を添加した場合、微粒子を加えない場合と比較して呈色時間が早くなることを発見した。そこで、反応時に微粒子が共存することで、分散微粒子抽出法の構成要素の1つである「呈色」にどのような影響がみられるか検討した。本法は、同研究室の松平光暉（卒業論文(2018)）との共同研究であり、原理の考案やデータの解析を筆者が担当した。

3.1.1. 本研究における捕集形態について

本研究では、*N*-1-ナフチルエチレンジアミン吸光光度法を用いて亜硝酸 (NO_2^-) を測定した。本法の分析フローと呈色成分の吸着の仕組みを Scheme 3.1.1.-1 に示す。 NO_2^- はスルファニルアミド（被ジアゾ試薬）をジアゾ化し、*N*-1-ナフチルエチレンジアミン（カップリング試薬）を加えてアゾ色素を生成する。生成したアゾ色素を表面にプロピルスルホン酸を修飾して正の電荷を持たせたシリカゲル (SiO_2) へ静電吸着によって捕集した。



Scheme 3.1.1.-1 *N*-1-ナフチルエチレンジアミン法による NO_2^- の呈色反応

NO_2^- は、スルファニルアミドと *N*-1-ナフチルエチレンジアミンとの反応で、赤色のアゾ色素 (+) に変換した。

3.1.2. 亜硝酸 (NO₂⁻) の性質

NO₂⁻は窒素を含む有機化合物が生分解を受けたときに生成する物質の1つである。水中の亜硝酸は主に、肥料や家畜の糞尿、生活排水の混入によるアンモニアの酸化過程で生じるため、水質汚染指標の1つとして重要である[1]。亜硝酸の酸解離定数 (pKa) は、3.15[2]である。一般的な河川中で、亜硝酸態窒素は、大部分が亜硝酸イオンとして存在していると考えられる。環境中でも同様にNO₂⁻は、細菌類により生物化学的に、あるいは化学的に酸化や還元を受けてNH₄⁺、NO₃⁻から生成する (NH₄⁺ ⇌ NO₂⁻ ⇌ NO₃⁻) 中間体であり、比較的不安定である。また、亜硝酸塩は生体内に蓄積することはないが、人体内で亜硝酸塩が生成するとヘモグロビンを酸化して酸素運搬機能のないメトヘモグロビンに変える (メトヘモグロビン血症；特に乳児が敏感に反応する)。そして、亜硝酸塩は人体内で食品などに由来する第二級、第三級アミンと反応して、発がん性を疑われるニトロソアミンを生成するとされている。水質基準項目に硝酸と亜硝酸の合計で10 mg/L という基準値が設けられていたが、近年、健康被害 (副腎皮質球状帯の肥大) に注目が集まり平成26年から水質基準項目に亜硝酸単体で0.04 mg NO₂⁻-N/L と基準値が設定された。汚染が進んでいない水に含まれる亜硝酸イオンの濃度は極めて低く、公定法では測定できない程度であることも多いため、より高感度で迅速な定量法の開発が求められている。

亜硝酸イオンの吸光光度定量は、一般的に亜硝酸により芳香族アミン (被ジアゾ試薬) をジアゾ化し、ナフタレン誘導体 (カップリング試薬) を加えて強いピンクのアゾ色素を生成させる Griess 反応[3]に基づいて行われている。アゾ色素に変換するために多くの呈色反応[4-10]が提案されている。この中でも、亜硝酸の測定には、グリース (Griess) 試薬を用いてアゾ化合物を生成させる反応に基づく方法が汎用されている。代表的なものは、酸性条件で亜硝酸をスルファニルアミドとジアゾ化させ、生成したジアゾニウム塩と *N*-1-ナフチルエチレンジミンをカップリングさせ強いピンクのアゾ色素を生成させる吸光光度法が用いられている。

3.2. 分析法の開発

3.2.1. 実験

3.2.1.1. 装置と試薬

2.4.3.1.1. 装置と試薬に実験に用いた装置及び画像解析ソフトを記載した。亜硝酸ナトリウム、スルファニルアミド、*N*-1-ナフチルエチレンジアミン、シュウ酸、塩酸、グリシン塩酸塩、クエン酸 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。試薬は、特級を使用し、全て超純水を用いて調製した。吸着剤として、Wakogel[®] C-300 (形状：全多孔性破碎型, 粒径：45~75 μm), Wakogel[®] 50-PRS (プロピルスルホン酸：(SiO₂-C₃H₆SO₃⁻)) (形状：全多孔性破碎型, 粒径：40~63 μm), DOWEX[™] 50Wx8 (H⁺) (200~400 mesh) cation exchange resin を使用した。各吸着剤は、水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。

3.2.1.2. 確立した測定方法

亜硝酸の確定した簡易分析操作を示した。

1.5 mL マイクロチューブに、1 mg のスルファニルアミドと 0.1 mg の *N*-1-ナフチルエチレンジアミン、1.4 mg のシュウ酸を粉碎混合し 10 mg の SiO₂-C₃H₆SO₃⁻ を充填し作製した。試料 1 mL を加え、振り混ぜて 1 分間呈色させ再度振り混ぜ 30 秒間静置した。これを 2 回繰り返した。そして、沈積した粒子の色調から NO₂⁻ の濃度を求めた。本法は 5 分以内に操作が完了する。

3.2.1.3. 画像測色法

スマートフォンのカメラ機能でマイクロチューブを撮影した。背景を黒にして、吊るして撮影した。写真をパソコンに転送し、Adobe Photoshop CC 2019 のソフトウェアを使用して 8bit の画像に変換した。マイクロチューブ内に沈積した微粒子を拡大し、縦方向に 10 箇所スポイトツールを使って Gray 値と RGB 値を測定した。測定した 10 箇所を平均化してそれぞれの値を求めた。

3.2.2. 結果と考察

3.2.2.1. 吸着剤微粒子の選択

本研究では、ナフチルエチレンジアミン比色法[11]で NO_2^- をアゾ色素に変換し測定した (Scheme 3.1.1.-1)。シリカゲル (SiO_2) (Wakogel[®] C-300), 陽イオン交換樹脂 DOWEX[™] 50Wx8 (H^+), Wakogel[®] 50-PRS ($(\text{SiO}_2)\text{-C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$) を使用してアゾ色素の捕集率を調べた (Fig. 3.2.2.1.-1)。微粒子に吸着したアゾ色素 (+) の Gray 値を示した (Fig. 3.2.2.1.-1(B))。その結果, ナフチルエチレンジアミン比色法の酸性条件で SiO_2 の表面はシラノール基がプロトン化したため, 最も捕集率が低くなった。DOWEX[™] 50Wx8 (H^+) と $(\text{SiO}_2)\text{-C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$ は高い捕集率を得た。しかし, DOWEX[™] 50Wx8 (H^+) は黄色であるため, NO_2^- 濃度が低い場合, 肉眼で色調を比色することは困難であった。そのため, $(\text{SiO}_2)\text{-C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$ を NO_2^- 測定用の吸着剤粒子として選択した。

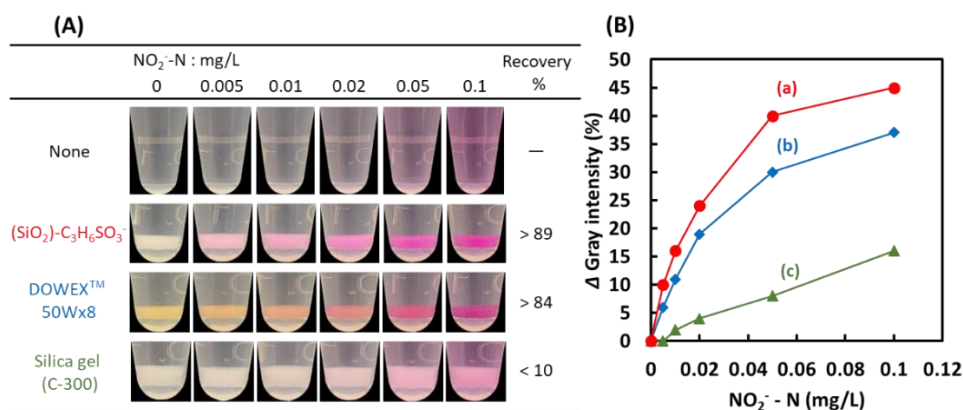


Fig. 3.2.2.1.-1 異なる NO_2^- 濃度で得られた微粒子の色変化

(A) 種類ごとの微粒子の色変化, (B) NO_2^- の検量線

吸着剤微粒子の種類; (a) $(\text{SiO}_2)\text{-C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$, (b) DOWEX[™] 50Wx8 (H^+), (c) silica gel (C-300)

3.2.2.2. pH 調整を用いる酸性試薬の選択

塩酸は酸性溶液として実験室で容易に利用できる。しかし, 安全性や操作性の点から簡易分析法には適していないため, 塩酸の代替の試薬として, クエン酸, グリシン塩酸塩, シュウ酸の粉末試薬を用いて比較した。アゾ色素の色調は pH で変化する。異なる酸性試薬を使用して pH 2.3 の条件で溶液の吸光度を測定したところ, 同様の結果が得られた。さらに, $(\text{SiO}_2)\text{-C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$ への捕集率が同じであった (Table. 3.2.2.2.-1)。したがって, 粉末試薬の添加量が最小量となるシュウ酸を選択した。

Table. 3.2.2.2.-1 NO₂⁻の呈色と捕集率に対する酸の影響

捕集率は、水相の吸光度 (540 nm) から求めた。吸着条件；NO₂⁻-N：0.1 mg/mL, (SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻：10 mg, 試料量：1 mL

Acid	Added	Abs. 540 nm	Recovery/ %
HCl	4.8 μL/mL	0.275	83
Citric Acid	26 mg/mL	0.304	84
Glycine Hydrochloride	3.1 mg/mL	0.284	85
Oxalic Acid	1.4 mg/mL	0.294	84

3.2.2.3. 定量範囲

Fig. 3.2.2.3.-1 に NO₂⁻の測定結果を示した。写真から、本法は μg/L レベルの NO₂⁻を容易に目視で判定することができた。画像解析で沈積した微粒子の Gray 値を測定したところ、NO₂⁻濃度に応じて変調が得られ、 $y = 1.51x - 0.02x^2$, $R^2 = 0.993$ (n=3) で、μg/L 濃度の定量が可能であった。本法の検出限界は 1.7 μg/L であった。吸光光度法のナフチルエチレンジアミン比色法の定量範囲 2~25 μg/L(光路長 1 cm)と比較すると、この方法は 1 mL の試料量で十分な感度を持つ[11]。また、μPAD を用いた分析方法 (サンプル量：20 μL, LOD：47 μg/L) よりも高感度に測定できた[12]。さらに、本法は、WHO によって設定された飲料水基準[13]、環境基準値である水質基準を十分に測定できた。

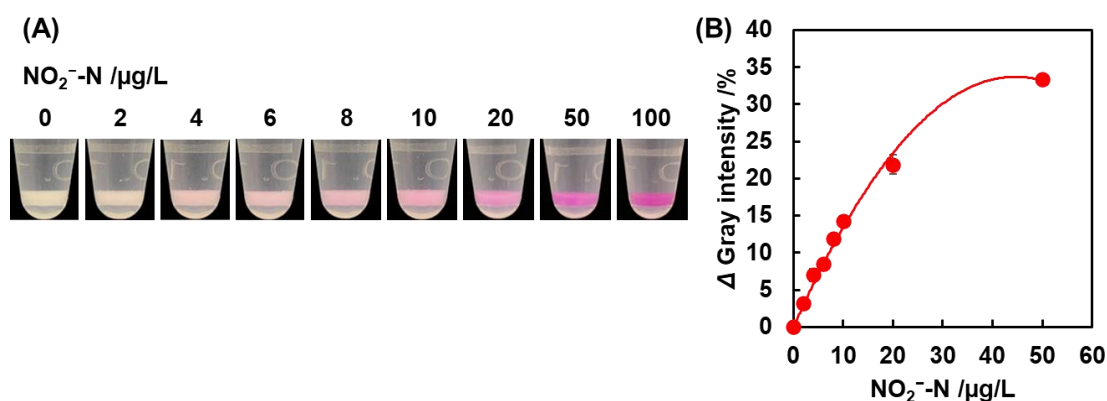


Fig. 3.2.2.3.-1 (SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻の色変化

(A) 異なる NO₂⁻濃度で得られた微粒子の色の变化, (B) (SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻：10 mg を吸着剤微粒子として使用した時の NO₂⁻の検量線

3.2.2.4. 溶液の呈色速度と微粒子の呈色速度

亜硝酸の呈色が一定になるには時間がかかる。本法は、目的物質が発色する速度も測定
の時間に影響を与えるため、呈色反応にどの程度、時間を要するか測定した。溶液のみと、
微粒子を添加した場合での呈色反応曲線を比較した結果を Fig. 3.2.2.4.-1 に示す。溶液のみ
の反応は吸光度法（極大吸収波長：540 nm）で測定し、40 秒間隔で測定した。微粒子を
添加した場合は、NO₂⁻-N 溶液を添加後、10 秒間振り混ぜ 30 秒静置し沈積した微粒子をス
マートフォンで撮影し、撮影した画像から Photoshop で Gray 値を求めた。この操作を繰
り返し、微粒子の時間ごとの色調変化を測定した。亜硝酸濃度は 10 μg/L で測定した。そ
の結果、NO₂⁻-N 溶液を添加後から 4 分では、溶液のみの反応は呈色（吸光度）が一定と
ならず増加しているが、微粒子の呈色（Gray 値）は一定になり、微粒子が呈色反応時に加
わることで溶液のみよりも早く呈色反応が完了した。溶液のみと比較して、本法は測定時
間（呈色反応時間）を短縮することができた。

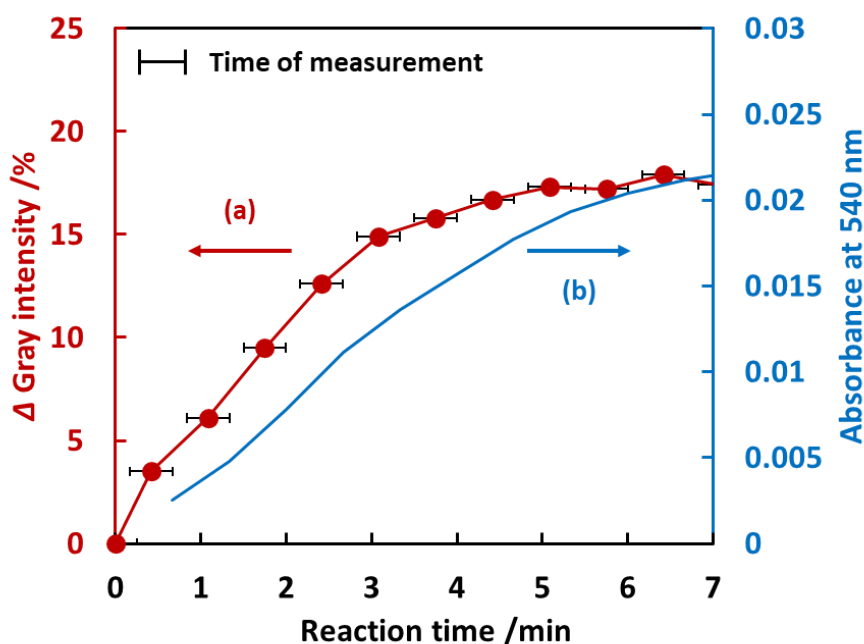
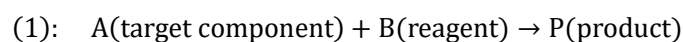


Fig. 3.2.2.4.-1 水相と固相の時間ごとの着色

(a) 微粒子, (b) 水相: 水相および固相の色は、それぞれ分光測光法(540 nm)と画像解析
(Gray 値の割合(%))で測定した。吸着条件; NO₂⁻-N: 0.1 mg/mL (固相), 1.0 mg/L
(水相), (SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻: 10 mg, 試料量: 1 mL

3.2.2.5. 2次速度式からみる呈色反応速度への影響

上述のように微粒子を加えた場合の測定時間と溶液のみの測定時間を比較したところ、予想外にも微粒子の存在によって着色が促進した。溶液では、微粒子の着色は約 5 分で完了したが、アゾ色素の形成反応は平衡に達するまでに 15 分以上必要である (Fig. 3.2.2.4.-1)。微粒子を添加した亜硝酸の呈色反応を速度式に当てはめ解析し、測定時間が短縮した要因を探った。そこで、この興味深い結果を次のモデルで解析した。目的成分 A が発色試薬 B と反応して発色体 P が生成するとき、P の生成速度 Eq. (3.2.2.5.-1) で求められる [14]。



$$\frac{dC_{Pt}}{dt} = k(C_{A0} - C_{Pt})(C_{B0} - C_{Pt}) \quad \text{Eq. (3.2.2.5.-1)}$$

ここで、 C_{A0} と C_{B0} は A と B の初期濃度、 C_{Pt} は時間 (t) における P の濃度である。一般的に、P の定量化には C_{A0} よりも大過剰に C_{B0} を添加する。そのため、 $C_{B0} \gg C_{Pt}$ となる。したがって、Eq. (3.2.2.5.-1) は次のように表される。

$$\frac{dC_{Pt}}{dt} = kC_{B0}(C_{A0} - C_{Pt}) \quad \text{Eq. (3.2.2.5.-2)}$$

t = 0 から t = t の結果から Eq. (3.2.2.5.-2) を結合し Eq. (3.2.2.5.-3) が得られた、

$$\ln \left[\frac{1}{(C_{A0} - C_{Pt})} \right] = kC_{B0}t - \ln C_{Pt} \quad \text{Eq. (3.2.2.5.-3)}$$

水相、固相の着色の速度を同様に考えた。Eq. (3.2.2.5.-3) を用いて水相と固相の呈色速度を算出した。その結果、水相と固相の両方の反応で良好な線形関係を示し、微粒子を使用して得られた勾配は、溶液を使用して得られたものと比較して約 2 倍急勾配であった (Fig. 3.2.2.5.-1)。k と C_{B0} の値は Eq. (3.2.2.5.-3) の傾きによって求められる。したがって、微粒子の存在下では C_{B0} の濃度の違いが呈色速度に影響を与えていると解釈できる。微粒子の添加によって呈色反応が促進された要因を探るために、呈色試薬及び生成物の微粒子存在下での溶液中の濃度を測定した。スルファニルアミド及び N-1-ナフチルエチレンジアミンを 0.05 mM に調製しこれを初濃度、各溶液 1 mL へ (SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻ 10 mg を添加し

30 秒間攪拌し遠心分離した上澄み液を平衡濃度として、紫外部吸収を測定した。その結果を Fig. 3.2.2.5.-2 に示す。添加した試薬及び生成物が微粒子表面に集まり高濃度になっており、スルファニルアミドでは 54%, *N*-1-ナフチルエチレンジアミンは 93% 捕集されていた。試薬が微粒子表面に集まる理由として、使用している微粒子、 $(\text{SiO}_2)\text{-C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$ は酸性条件でも表面電荷が負に帯電し、添加した試薬は正電荷をもつため、静電吸着が起きたためと考えられる。実際、吸着剤微粒子の存在により、ジアゾ化試薬 Fig. 3.2.2.5.-2(A) とカップリング試薬 Fig. 3.2.2.5.-2(B) の吸光度の値が大幅に低下し、微粒子に捕集していることを確認した。呈色試薬は微粒子表面に濃縮されることで、発色反応が促進されたと考えられる。この反応速度への与える影響は新しく提案した本分析原理の大きな利点である。

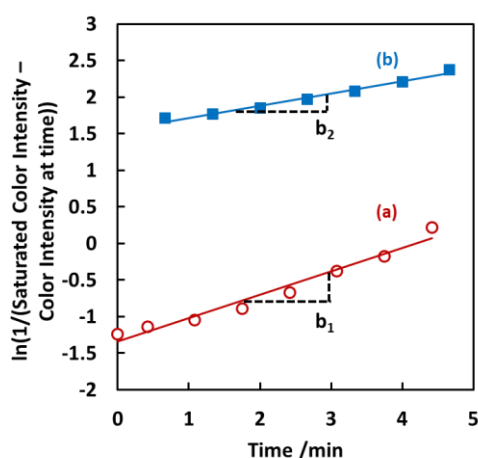


Fig. 3.2.2.5.-1 水相と微粒子（固相）の着色の時間の関係
(a) 微粒子（固相）、(b) 水相

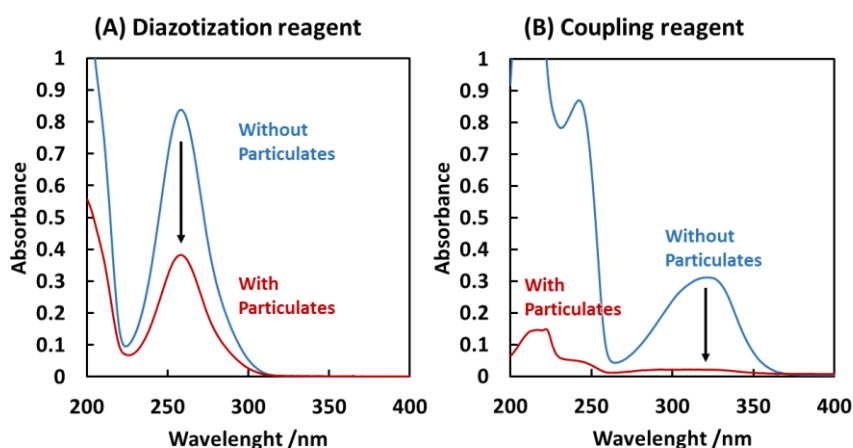


Fig. 3.2.2.5.-2 微粒子の存在下での発色試薬の吸収スペクトルの違い
(A) ジアゾ化試薬 (0.05 mM), (B) カップリング試薬 (0.05 mM) (微粒子なし：青線, 微粒子あり：赤線)

3.2.2.4. 有色成分の影響

亜硝酸は地下水や農業用水から検出される。それらの試料中には、しばしば有色成分の夾雑物が共存し、比色測定を妨害する。そこで、環境水中に含まれる有色の高分子有機酸であるフミン酸を用いて本法への有色成分の影響を検討した。予め粉末試薬を添加した1.5 mL マイクロチューブへ 100 $\mu\text{g/L}$ 亜硝酸溶液、0~100 mg/L フミン酸を滴加し、それぞれの Gray 値を求め、比較した (Fig. 3.2.2.4.-1)。従来法だと少量のフミン酸で測定値に影響を及ぼすが、吸着剤を添加することでフミン酸濃度が 10 mg/L までは目視での測定ができた。自然水中に含まれるフミン酸濃度は河川が 7 mg/L、富栄養湖が 10 mg/L であるため、本法は自然水を測定する際、有色成分の影響を受けにくいといえる。

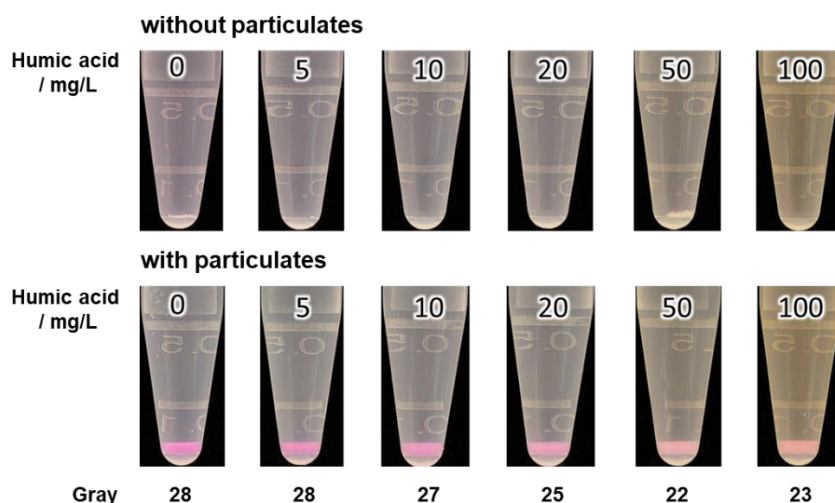


Fig. 3.2.2.4.-1 フミン酸共存下の $(\text{SiO}_2)\text{-C}_3\text{H}_7\text{SO}_3^-$ への亜硝酸（アゾ色素）の吸着の様子と微粒子の色変化

3.2.3. 実試料への応用

3.2.3.1. 環境水の測定

本法を用いて環境水の測定を行った (Table. 3.2.3.1.-1)。富山大学内の用水である古川と神通川の測定をした。古川は、2019年1月24日に採取した。採水の際、わずかに降雨があった。神通川は、2019年2月1日の降雨時と2019年2月3日降雨なしの日に採取した。本法を目視、画像解析法 (Gray)、吸光光度法で測定したところ、2つの河川は機器分析法 (吸光光度法) と比較してよい一致が得られた。本法は河川水に応用可能である。

Table. 3.2.3.1.-1 環境水への応用

Sample (day)	This method / $\mu\text{g/L}$		Spectrophotometry / $\mu\text{g/L}$
		Gray intensity $\mu\text{g/L}$	
'19. 1/24	4-6	6.7	5.2
'19. 2/1	20	19.0	19.5
'19. 2/3	10	11.5	11.4

3.3. まとめ

亜硝酸をナフチルエチレンジアミン法で $(\text{SiO}_2)\text{-C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$ を添加して呈色させたところ、水相の反応と微粒子の呈色速度が異なった。そこで、微粒子の添加が呈色速度にどのような影響を与えるか、2次速度式を用いて解析した。その結果、微粒子を添加した場合、水相の反応に比べ呈色速度が2倍速くなった。これは、添加した試薬（スルファニルアミド、*N*-1-ナフチルエチレンジアミン）及びジアゾニウム塩（電荷：+）が $(\text{SiO}_2)\text{-C}_3\text{H}_7\text{SO}_3^-$ （電荷：-）へ吸着し、微粒子表面の試薬濃度が高濃度になったため呈色速度が短縮したと考えられる。水相の呈色反応に微粒子を共存させる分散微粒子抽出法は、呈色促進効果（測定時間の短縮）が期待できる分析法である。

3.4. 参考文献

- [1] A. Kurunc, S. Ersahin, B. Yetgin Uz, N.K. Sonmez, I. Uz, H. Kaman, G.E. Bacalan, Y. Emekli, *Agricultural Water Management*, (2011), 98, 1013-1019. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2011.01.010>
- [2] 日本分析化学会編, 分析化学データブック (改訂5版), (2004)
- [3] P. Griess, *Chem. Ber.*, (1879), 12, 426-428. <https://doi.org/10.1002/cber.187901201117>
- [4] D. Amin, *Analyst*, (1986), 111, 255-257. <http://dx.doi.org/10.1039/an9861100255>
- [5] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition, APHA, AWWA and WPCF. (1992)
- [6] JIS K0102 E (1998)
- [7] M. Miró, A. Cladera, J. M. Estela, V. Cerdà, *Analyst*, (2000), 125, 943-948. <https://doi.org/10.1039/A910263I>
- [8] R. F. Rider, M. G. Mellon, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, (1946), 18, 96-99. <https://doi.org/10.1021/i560150a003>
- [9] 水質試験方法 (改訂版), 日本工業用水協会(編), (1984)
- [10] 上水試験方法, 日本水道協会, (1985)

- [11] F. W. Gilcreas, *Am. J. Public Health Nations. Health*, (1966), 56, 387-388.
- [13] WHO, Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first and second addenda, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240045064> (Accessed 2022)
- [12] B. M. Jayawardane, S. Wei, I. D. McKelvie, S.D. Kolev, *Anal. Chem.*, (2014), 86, 7274-7279.
<https://doi.org/10.1021/AC5013249>
- [14] 小木修, *ふんせき*, (2014), 3, 94-100.

第4章 ホルムアルデヒドの簡易比色分析法

—微粒子の吸着力が測定へ与える影響—

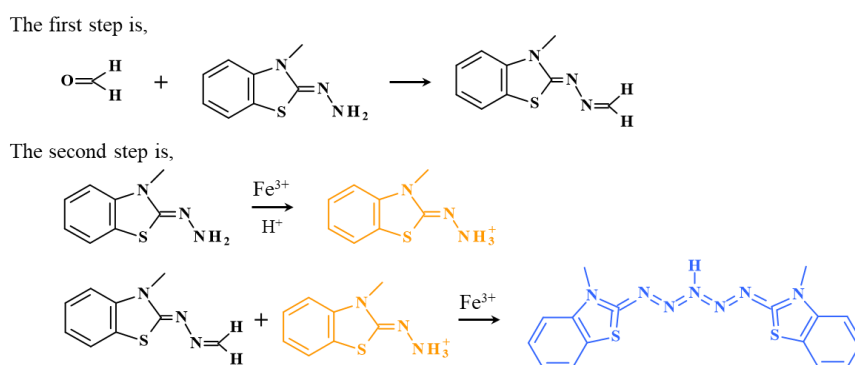
4.1 はじめに

第2章で論じた $[\text{Fe}(o\text{-phen})_3]^{2+}$ 錯体を用いた微粒子への単成分の吸着の発展として、ホルムアルデヒドをMBTHで呈色させて、色の異なる2成分が存在する系を検討した。性状の異なる微粒子へ2成分を微粒子に吸着させ、各成分の吸着定数を算出し、検出される色調変化を推定する色調モデルを作成した。微粒子の化学的性質から2成分の吸着によって生じる色調変化と測定感度の変化を調査した。

4.1.1. 本研究における捕集形態について

ホルムアルデヒドの測定に感度が高いMBTH法が汎用的に用いられている[1]。MBTH法はScheme 4.1.1.-1に示すような反応である。まず、ホルムアルデヒドをMBTHとの反応でアジンに変換する。そこへ、 Fe^{3+} を加え過剰に存在するMBTHを酸化して、この酸化型MBTH（[黄色イオン]⁺）を先に生成しているアジンと反応させて青色の色素（[青色イオン]⁺）に変換する。溶液は、黄→緑→青の色調変化がみられる。

生成された色の異なる2成分はともに陽イオンであるため、微粒子には表面に負電価を持つものを選択し、静電吸着を利用した。また、生成する2成分が疎水的な構造をとっていることを利用して、無電荷の微粒子への吸着を検討した。



Scheme 4.1.1.-1 MBTH法によるHCHOの呈色反応

HCHOをMBTHで反応させて青色の陽イオン色素に変換した

4.1.2. ホルムアルデヒドについて

ホルムアルデヒド (formaldehyde, 化学式 HCHO) [2]は、鋭い刺激臭を有する可燃性の気体である。非常に水に溶けやすく 55%まで溶解する。HCHO の人為的な直接排出源としては、化石燃料の燃焼、産業からの排出、建材や製品からの放出が報告されている。ガソリン中に HCHO は含有されないが不完全燃焼によって生成するため、結果として内燃機関から排出され、自動車の排ガス中に含まれている。産業からの排出として、化学薬品工場、パルプ・製紙工場、林産物工場、タイヤ・ゴム工場、石油精製・石炭加工工場、織物工場、自動車製造工場、金属製品工場などからの排ガス中で検出されている。また、自然界から発生する HCHO も存在する。森林の自然火災のようなバイオマスの燃焼や、水中の腐植物質に日光が照射することによって HCHO が生成することが報告されている [3,4]。HCHO は吸入毒性が高く、ヒトに対して発がん性を示すことが明らかにされている。そのため使用や保管、排出に関しては各種の法律で規制されている [5-9]。水中の HCHO の有害性にも関心が高く 2003 年に HCHO の水道水基準値として、0.08 mg/L が制定された。この値は WHO 飲料水質ガイドラインにおける指針値 (0.9 mg/L) から吸入曝露量を考慮して定められた。また、水生生物の保全を目的として、2003 年に水質要監視項目指針値が環境基本法で制定されている。この指針値の値は、河川や湖沼などの淡水域で 1 mg/L、一般海域で 0.3 mg/L、魚介類の産卵場である海域の特別域では 0.03 mg/L となっている。

4.2. 分析法の開発

4.2.1. 実験

4.2.1.1. 装置と試薬

2.4.3.1.1. 装置と試薬に、実験に用いた装置及び画像解析ソフトを記載した。ホルムアルデヒド標準液(98%)、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩一水和物 (MBTH)、塩化鉄(III)六水和物 (FeCl₃)、塩酸、酢酸、酢酸ナトリウム (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) は特級を使用し、溶液は全て超純水を用いて調製した。吸着剤として、Wakogel[®] C-300 (SiO₂) (形状：全多孔性破砕型、粒径：45~75 μm)、Wakogel[®] 50-PRS ((SiO₂)-C₃H₇SO₃⁻) (形状：全多孔性破砕型、粒径：40~63 μm)、DOWEX[™] 50Wx8 (H⁺) (200~400 mesh)、Amberlite[®] DAX-8、Accubond ODS-C₁₈ (研究室にあったもの) を使用した。各吸着剤は、水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。Amberlite[®] DAX-8 は乳鉢で粉碎したものを使用した。

4.2.1.2. 確立した測定方法

ホルムアルデヒドの確定した簡易分析操作を示した。

HCHO の測定には MBTH 法を用いた，二段階反応で測定した。1.5 mL マイクロチューブに試料 1 mL に 0.4 mg の MBTH と 7 mg の酢酸ナトリウムを加え，30 秒間振り混ぜ 10 分間呈色させた。次に，2.7 mg の FeCl_3 と 10 mg の SiO_2 をマイクロチューブに添加し，振り混ぜて 5 分間呈色させ再度振り混ぜ 30 秒間静置した。そして，沈積した粒子の色調から HCHO の濃度を求めた。本法は 20 分以内に操作が完了する。

4.2.2. 結果と考察

4.2.2.1. 呈色試薬 (MBTH) の添加量の検討

呈色試薬の最適な添加量を検討した。ホルムアルデヒド濃度を 0.08 mg/L に固定して，呈色試薬の MBTH 濃度を 0~32 mM の間で変えて呈色させ， SiO_2 10 mg へ吸着させた。この結果を Fig. 4.2.2.1.-1 に示す。微粒子を添加しない場合を上部に微粒子を添加した場合を下部に示した。MBTH 濃度に応じてホルムアルデヒド濃度が同じでも溶液と微粒子に現れる色が異なった。MBTH 濃度が色調変化に大きく影響していることが考えられる。微粒子添加なしと微粒子を添加ありの溶液のスペクトルを Fig. 4.2.2.1.-2 に示す。微粒子添加なしのスペクトルより，MBTH 濃度の上昇に伴って 450 nm 付近の吸光度が上昇し，溶液中の[黄色イオン]⁺と[青色イオン]⁺の比率が MBTH 濃度ごとに変化した。微粒子添加ありのスペクトル変化より， SiO_2 へ[黄色イオン]⁺と[青色イオン]⁺がともに吸着していた。呈色試薬 MBTH 由来の[黄色イオン]⁺とホルムアルデヒド由来の[青色イオン]⁺の比率が変化することで，微粒子に現れる色調が変化すると考えられる。

MBTH 濃度が 2 mM の場合，ホルムアルデヒド濃度を適宜変化させたときの微粒子の色調がどのように変化するかをみた結果を Fig. 4.2.2.1.-3 (MBTH 2 mM) に示す。Fig. 4.2.2.1.-3 より，MBTH 濃度が低濃度である場合，ホルムアルデヒド濃度に応じて微粒子の色が黄緑色から青色に変化した。MBTH 濃度ごとに異なった色調変化が現れたことから，MBTH 濃度がホルムアルデヒドの測定範囲に影響している。

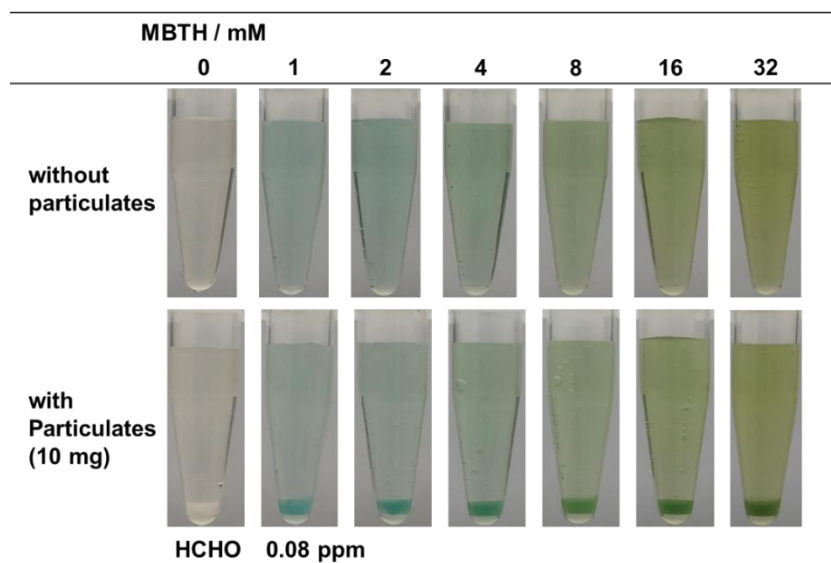


Fig. 4.2.2.1.-1 MBTH 濃度ごとの水相と微粒子の色変化

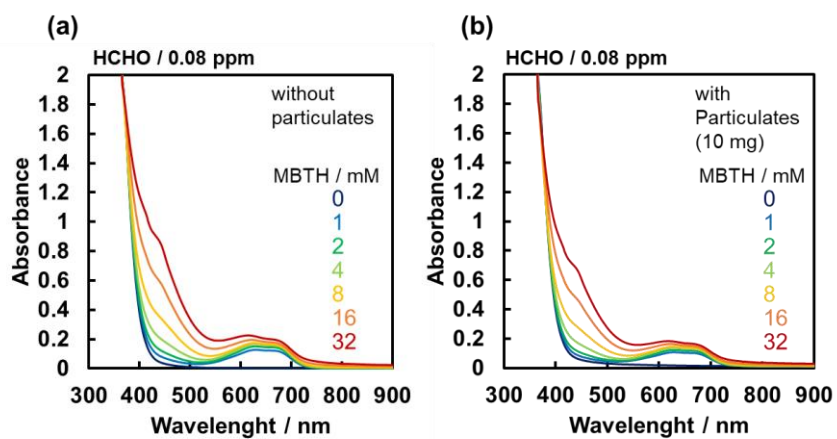


Fig. 4.2.2.1.-2 MBTH を変えたときの水相の吸光度変化

(a) 微粒子添加前の水相のスペクトル, (b) 微粒子添加後の水相のスペクトル

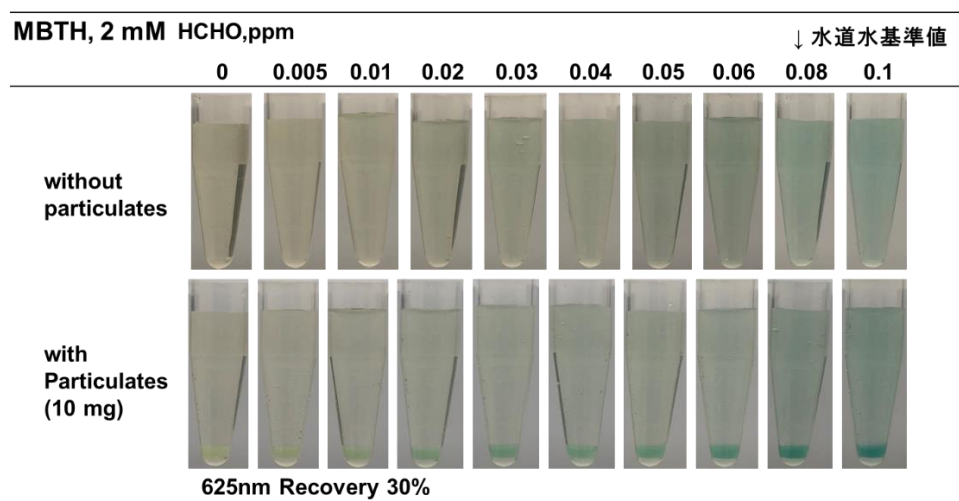


Fig. 4.2.2.1.-3 MBTH 2 mM の時の水相と SiO₂ の色調の比較

4.2.2.2. 微粒子の選択

本研究では、HCHO の呈色に MBTH 比色法を使用した (Scheme 4.1.1.-1) [1]。この呈色法は二段階の反応である。最初に、MBTH は HCHO をアジンに変換し、過剰な MBTH が Fe³⁺ で酸化されて酸化型 MBTH (黄色のカチオン) が形成する。そして、酸化された MBTH がアジンと反応して青色のカチオン色素が生成する。HCHO 濃度に応じて、溶液の色調が黄色から青色に変化する。この溶液には青色と黄色の両方の種が含まれている。青色陽イオンの捕集率を 7 つの異なる陽イオン交換体と疎水性中性物質を使用して検討した。Fig. 4.2.2.2.-1 に示すように、HCHO 濃度による粒子の色変化は、吸着剤の種類によって大きく異なった。SiO₂ と (SiO₂)-C₃H₇SO₃⁻ では、HCHO 濃度の増加に伴い、色が黄色から緑色、青色に変化した。Dowex™ 50Wx8 (H⁺) は、樹脂 (橙色) の影響で、茶色から緑色に変色した。Accubond ODS-C₁₈ と DAX-8 は、白から青に色が変わった。

[青色イオン]⁺ の捕集率は、50Wx8 と DAX-8、ODS-C₁₈ では約 90% と高かったが、50Wx8 はもともと樹脂に色があるためホルムアルデヒド濃度に応じた色調変化が読み取りにくかった。DAX-8 と ODS-C₁₈ では、単色の色変化となりホルムアルデヒド濃度に応じて濃淡変化が現れ、DAX-8 の方が ODS-C₁₈ よりも変化が鮮明であった。DAX-8 は [青色イオン]⁺ のみを分離して選択的に測定することができる。しかし、SiO₂ のような捕集率は 35% 前後と低いが、わずかに黄色が混合した色調変化の方が目視でホルムアルデヒド濃度を明瞭に判断することができた。そこで、最適な微粒子をホルムアルデヒド濃度の判定が容易な SiO₂ と DAX-8 とした。

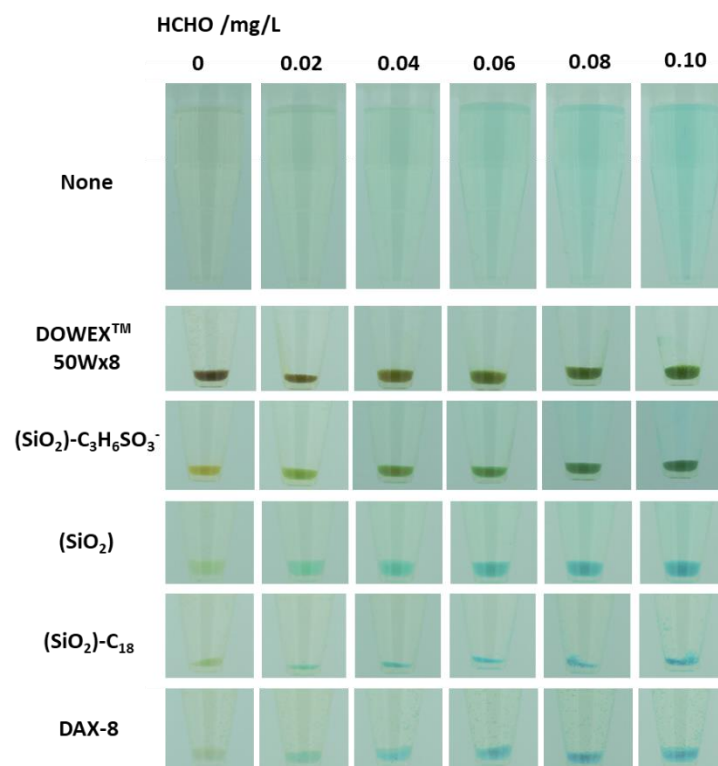


Fig. 4.2.2.2.-1 HCHO 濃度ごとの微粒子の色変化
 上から：粒子なし，DOWEX™ 50Wx8 (H⁺)，(SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻，SiO₂(C-300)，DAX-8，
 (SiO₂)-C₁₈

4.2.2.3. 定量範囲

ホルムアルデヒド濃度と微粒子の色の濃淡変化の関係をみた。画像を撮影し、沈積した微粒子のマイクロチューブの中央部分を正方形 (50 pixel×50 pixel) で Gray 値を抽出し、Gray 値の階調を Photoshop で測定した。Fig. 4.2.2.2.-1 の SiO₂ 写真の分析から得られた検量線から、Gray 値と HCHO 濃度の 0.02~0.08 mg/L の範囲で直線関係が得られ、 $y = 256x$ (n=5), $R^2 = 0.99$ であった (Fig. 4.2.2.3.-1)。検出限界は ($3\sigma_B$) は 0.02 mg/Lであった。黄色成分を含んだ色調変化の場合、低濃度では Gray 値に影響を受けずに測定できる。

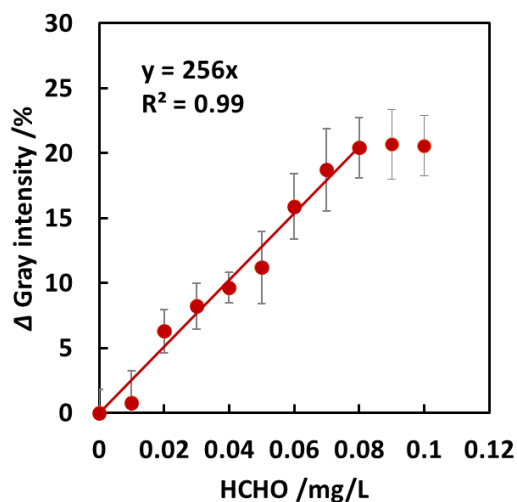


Fig. 4.2.2.3.-1 微粒子に SiO₂ を使用した HCHO の検量線

4.2.3. 実試料への応用

4.2.3.1. 雨水への応用

本法を用いて、雨水の測定を行い吸光光度法と本法を比較した。レインゴーランドを用いて富山大学理学部中庭で採水した雨水を 2 倍希釈して測定した。富山市の降雨の初めに収集された雨水のサンプルを、本法と吸光光度法を用いて測定し比較したところ、本法と吸光光度法の測定結果はよく一致した (Table. 4.2.3.1.-1)。

Table. 4.2.3.1.-1 雨水中の HCHO の分析結果

採水した試料を 2 倍に希釈し本法と吸光光度法で測定した

Sample	This method	Spectrophotometry
A	0.08 mg/L	0.060 mg/L
Rain water B (a)	0.12 mg/L	0.120 mg/L
(b)	0.08 mg/L	0.083 mg/L

(a): bigging of rainfall, (b): middle stage of rainfall

4.2.3.2. 現場分析に適したデバイスの開発

現場で簡単に操作できるシンプルなチューブベースのデバイスを開発し、2段階の反応場を必要とするMBTH法に適用した。このデバイスの構造と操作をFig. 4.2.3.2.-1に示す。このデバイスは、マイクロチューブのような小さな先端を持ち、シリコンやゴムのチューブで構成されている (Fig. 4.2.3.2.-1 (A))。試料溶液を採水するための細いポリエチレンチューブを有するため、試料量の採水は簡単に制御できる。デバイス内部はプラスチックの多孔板で仕切られている。試料水は、シリコンチューブの本体を指圧で圧縮することで各セルを移動することができる。試料溶液は第1セル (1stcell) で採水され、そこでHCHOはMBTHと反応してアジンを生成する。反応後、Fig. 4.2.3.2.-1 (B)に示したように、セル本体を指圧で圧縮することで第2のセル (2ndcell) に溶液を移動する。塩化鉄(III)とSiO₂は2番目のセルに充填してあり、塩化鉄(III)は前駆体と反応して青色と黄色の2成分を形成する。着色成分はセル内で直ちにSiO₂に吸着する。この2槽式のデバイスは、他の比色反応の応用にも適している。

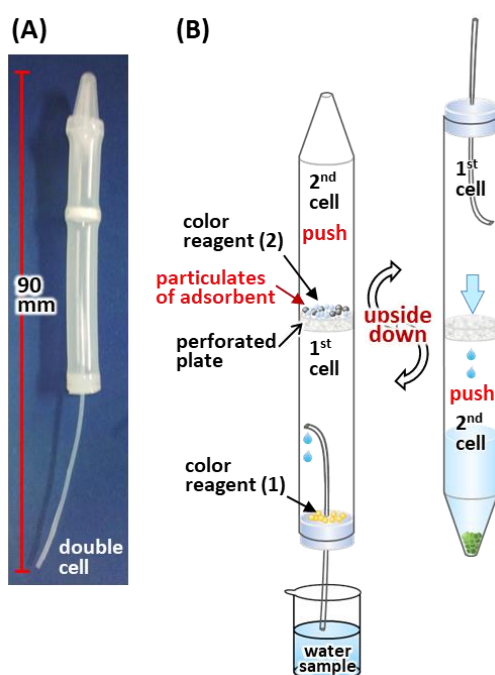


Fig. 4.2.3.2.-1 現場でも簡単に操作できるシンプルなチューブ基盤のデバイス

(A) デバイスの写真, (B) MBTH法を使用した場合の操作スキーム

試料溶液を1st cellに採水し、そこでHCHOはMBTHと反応しアジンを形成する。そして、セル本体を回転しチューブの圧着で、2nd cellに溶液を移動させ青色色素を生成させる。

4.2.4. 捕集のデータの解析

4.2.4.1. 2成分の吸着定数より色調の尺度の推定

微粒子の色の変化は、固体表面の黄色と青色の種の本数比が変ることによって引き起こされる。MBTH 法では、過剰な呈色試薬から生成されるイオン ([黄色イオン]⁺) と MBTH とホルムアルデヒドが反応して生成されたイオン ([青色イオン]⁺) の 2 成分が生成する。素材によって現れる色調の違いを生成する 2 成分の吸着挙動から考察した。水相中での色調変化は、生成した 2 成分の比率で決まるが、微粒子での色調変化は、各成分の吸着力の比率によって変わるため溶液の色の変化とは異なる。そこで各成分の吸着力を求めるため、[黄色イオン]⁺ (Abs. 435 nm) と [青色イオン]⁺ (Abs. 625 nm) の吸着等温線を作成し、Henry の Eq. (4.2.4.1.-1) から吸着定数を算出した。吸着力=吸着定数とした。

色の変化に対する理論的アプローチは、2 種の吸着等温線に基づき、着色種の吸着等温線は、式で表した。Eq. (4.2.4.1.-1) および Eq. (4.2.4.1.-2) で実験条件下の Henry の方程式を次のように使用した。

$$\frac{W}{m} = KC_{eq} \quad \text{Eq. (4.2.4.1.-1)}$$

$$W = V_w(C_0 - C_{eq}) \quad \text{Eq. (4.2.4.1.-2)}$$

ここで、 W は吸着成分の量、 V_w は水相の体積、 C_0 と C_{eq} は物質の初期濃度と平衡濃度、 m は微粒子の量、 K は吸着定数である。 W/m 比は、粒子の色の強さ、つまりメソッドの感度を示します。1 mL の着色溶液と 10 mg の微粒子を 1.5 mL マイクロチューブに入れ、25 °C の水浴中で 1 分間振とうした。遠心分離後、上清の吸光度を測定した (Fig. 4.2.4.1.-1)。 C_{eq} および W 値は、吸光度から計算した。

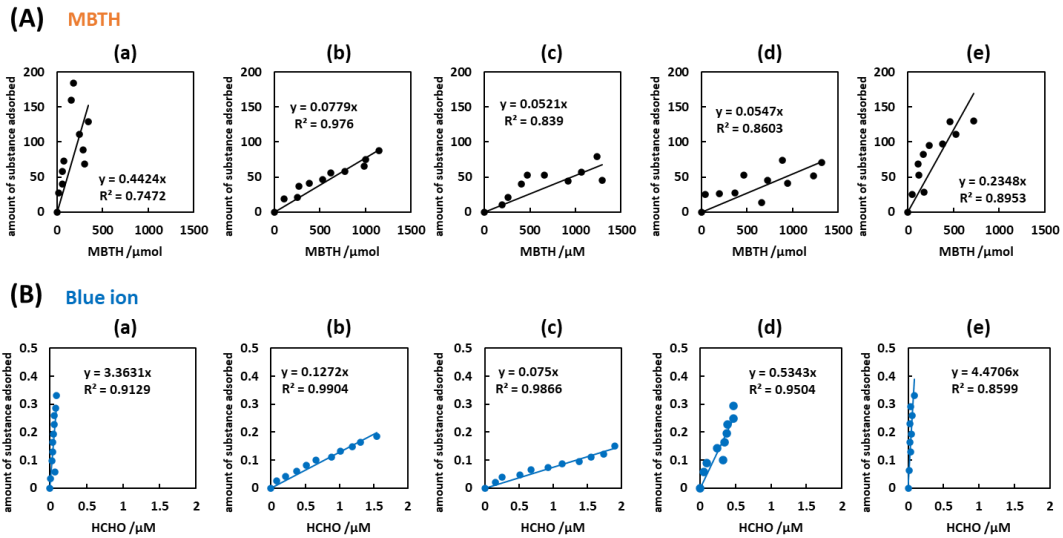


Fig. 4.2.4.1.-1 微粒子ごとの吸着等温線

(A) 呈色試薬由来の[黄色イオン]⁺, (B) HCHO 由来の[青色イオン]⁺

(a) SiO₂(C-300), (b) (SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻, (c) DOWEX™ 50Wx8 (H⁺), (d) (SiO₂)-C₁₈, (e) DAX-8
(Kは, モル濃度, v (L), m (kg) で表記した)

Table. 4.2.4.1.-1 に青と黄色の種の吸着定数 K_B , K_Y , およびそれらの比率をまとめた。DAX-8, ODS-C₁₈, Dowex™ 50Wx8 (H⁺)などの疎水性吸着剤では $K_B \gg K_Y$ であるのに対し, (SiO₂)-C₃H₇SO₃⁻および SiO₂陽イオン交換体では $K_B > K_Y$ です。質量 m の微粒子に吸着された青と黄色の種は, 次のように等温方程式と物質収支から計算した。

$$W_B = V(C_{B0} - C_{Beq}) = mk_B C_{Beq} \quad \text{and} \quad W_Y = V(C_{Y0} - C_{Yeq}) = mk_Y C_{Yeq} .$$

着色種の吸着量に対する色の強さを ε_B と ε_Y で表すと, 微粒子の色調は次のように表される。

$$\text{Color tone} = \frac{\varepsilon_B W_B}{\varepsilon_Y W_Y} = \left(\frac{\varepsilon_B k_B}{\varepsilon_Y k_Y} \right) \left(\frac{C_{Beq}}{C_{Yeq}} \right) .$$

Fig. 4.2.4.1.-2 に $\varepsilon_B W_B / \varepsilon_Y W_Y$ と HCHO 初期濃度の関係を示した。各吸着剤の材質ごとの吸着量の色調から作製したシミュレートモデルの曲線は, 吸着微粒子の観察された色の変化と一致している。

Table. 4.2.4.1.-1 吸着定数と K_B/K_Y の比 (B: 青色色素⁺, Y: 黄色色素⁺)

Adsorbent	K_B (kg L ⁻¹)	K_Y (kg L ⁻¹)	K_B/K_Y
SiO ₂	0.08	0.05	1.6
(SiO ₂)-C ₃ H ₆ SO ₃ ⁻	0.13	0.07	1.9
DOWEX™ 50Wx8	3.36	0.44	7.6
(SiO ₂)-C ₁₈	4.47	0.23	19.4
DAX-8	0.53	0.05	10.6

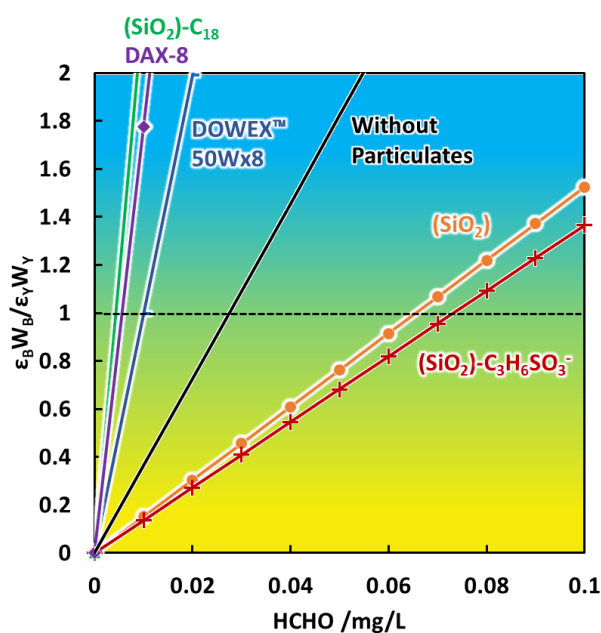


Fig. 4.2.4.1.-2 微粒子の種類と初期 HCHO 濃度に応じた実験的な色変化の模式図 $\epsilon_B W_B / \epsilon_Y W_Y$ と初期 HCHO 濃度の関係。 ϵ_B と ϵ_Y の色の補正としてそれぞれ 625 nm と 435 nm でのモル吸光係数として 53770 と 25 を用いた。

4.3 まとめ

ホルムアルデヒドを MBTH 法で呈色すると過剰に存在する呈色試薬の[黄色イオン]⁺と目的成分の[青色イオン]⁺の 2 成分が生成する。表面電荷の異なる微粒子を用いて吸着させたところ微粒子によって異なる色調変化が得られた。SiO₂ は、両成分ともに吸着し、[黄色イオン]⁺の吸着力<[青色イオン]⁺の吸着力であったため色調が黄緑色→青色と変化しホルムアルデヒド濃度変化が明瞭であった。DAX-8 は[黄色イオン]⁺の吸着力<<[青色イオン]⁺の吸着力であったため単色のみの濃淡変化となり、[青色イオン]⁺のみを分離して測定

することができた。本法は、水道水基準値の 0.08 mg/L 以下を測定でき、溶液のみと比較して約 10 倍の高感度化を達成した。また、微粒子の色調変化を Henry の式から算出した吸着定数を用いて微粒子の色味と各成分のモル吸光係数 (ϵ) から色調の尺度を算出し色調変化のモデルを作成した。分散微粒子抽出法は、微粒子の成分に対する吸着力の違いから色調変化を予想でき、測定感度を変えることができる。

4.4. 参考文献

- [1] E. Sawicki, T. R. Hauser, T. W. Stanley, *W. Elbert, Anal. Chem.*, (1961), 33, 93-96.
<https://doi.org/10.1021/ac60169a028>
- [2] CERi 有害性評価書 "ホルムアルデヒド", 財団法人化学物質評価研究機構, (2006)
- [3] IPCS UNEP/ILO/WHO, "Concise International Chemical Assessment Document, No. 40 Formaldehyde" (2002)
- [4] R. J. Kieber, X. Zhou, K. Mopper, *Limnol. Oceanogr.*, (1990), 35, 1503-1515.
- [5] 国土交通省告示第 1113 号-1115 号, (2002)
- [6] 国土交通省告示第 115 号, (2007)
- [7] 国土交通省告示第 101 号, (2003)
- [8] World Health Organization (WHO), *Formaldehyde in Drinkingwater*, (2005)
- [9] 環境省告示第 123 号, (2003)

第5章 酵素法を用いたリン酸の高感度な簡易分析法の開発

—微粒子の物理的な性状が測定へ与える影響—

5.1 はじめに

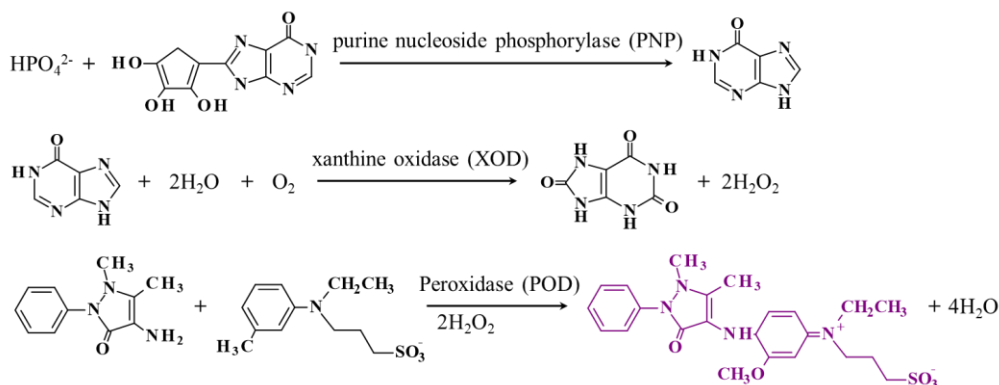
分散微粒子抽出法の「吸着」と「沈降」を微粒子のサイズと添加量といった物理的性質から捕集能や検出感度、測定範囲への影響を調査した。酵素法での測定分野の拡充を図った。

5.1.1. 酵素法とは

本研究で検討した酵素法では、特定の酵素が基質と反応し、過酸化水素 (H_2O_2) を生成する。生成した H_2O_2 量をペルオキシダーゼと呈色試薬を用いた呈色法で測定する方法である。酵素の特異的な反応を利用するため、夾雑物の影響を受け難く、目的成分を選択的に測定することができるため、医療分野や食品分野などの測定に広く用いられている[1-3]。本法の測定原理を酵素呈色法へ応用することで、酵素法の更なる高感度化、及び、本法の分析対象物質の拡充が期待できる。

5.1.2. 本研究の捕集形態について

本法の測定原理を (Scheme 5.1.2.-1) に示す。プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP : purine nucleosid phosphorylase) とキサンチンオキシターゼ (XOD : xanthine oxidase) の存在下で 1 mol の無機リンから 2 mol の過酸化水素 (H_2O_2) が発生する。この生成した H_2O_2 はペルオキシダーゼ (POD : peroxidase) 存在下で、4-アミノアンチピリン (4-AA) とトリンダー試薬を酸化結合することで、有色の双性イオンが生成する。この生成物を 550 nm で測定することで無機リンを定量する[4]。この比色法は、フェノール[5]とその誘導体[6, 7], およびリン酸[8]の測定に使用されている。生成した色素は有色の双性イオンであるため、疎水性相互作用を利用して中極性樹脂である XAD-7HP に捕集した。



Scheme 5.1.2.-1 PO_4^{3-} の呈色反応

PO_4^{3-} を 4-AA との酵素反応でピンク色の両性イオンに変換した

5.1.3. リン酸について

リン (phosphorus, P) は、すべての生命に含まれる重要な元素である。リン酸 (H_3PO_4) とその化合物は生命現象の極めて多くの局面で多様な役割を担っており、光合成や呼吸といったエネルギー獲得のプロセスから、脂質・タンパク合成といった二次代謝、あるいは生命体の維持 (遺伝現象) に至るまで、 H_3PO_4 は生化学プロセスのほとんどの場面で直接的かつ間接的に関与している。環境中では、土壌や多くの鉱物は H_3PO_4 の吸着能が高く、天然の陸水中のリン酸濃度は非常に低いことが多い[9]。しかし、海洋では多くの有機物を含む内湾域の海底堆積物が低酸素状態時にリン酸を放出するため、リン酸濃度は高くなっている。また、 H_3PO_4 は洗剤中に含まれていることから、生活排水や下水処理の過程でも放出される。そのため、人為的な汚染を受けている水系では、 H_3PO_4 が高濃度で検出される。淡水では“アオコ”や“アオミドロ”の大発生や沿岸域では赤潮の頻発などを引き起こす原因の一つであるため、 H_3PO_4 の定量的な測定が求められている。

H_3PO_4 の主な定量方法は、強酸性条件で測定するモリブデン酸アンモニウムを用いたモリブデン青比色法[10, 11]が主に用いられている。測定に使われる還元剤の検討も多岐にわたって行われ、1,2,4-アミノナフトールスルホン酸、硫酸第一鉄あるいは、硫酸第一鉄アンモニウム、*p*-メチルアミノフェノール、塩化第一スズなどで検討されている。また、比色法のマラカイトグリーンを用いた定量方法などが開発され、リン酸の測定法は多くの改良法が報告されている。モリブデン酸を用いた定量方法は環境水のリン酸の簡易分析法へ応用されている。モリブデンブルー法の測定は強酸条件であるため、あらかじめ試料を酸性に変化させる前処理が必要である。また、現場分析において強酸の使用は安全性の面で適していない。酵素法を用いたリン酸の測定は、モリブデン酸青法に比べ反応条件が穏やかで、感度も高く、優れた選択性があるため、環境水などのへの応用に適している。

5.2. 分析法の開発

5.2.1. 実験

5.2.1.1. 装置と試薬

2.4.3.1.1. 装置と試薬に、実験に用いた装置及び画像解析ソフトを記載した。リン酸二水素カリウム、クエン酸（無水）、クエン酸三ナトリウム二水和物（特級，FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）。イノシン（化学用，FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）。4-アミノアンチピリン（水質試験用，FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）。TOPS（N-エチル-N-スルホプロピル-3-メチルアニリン），ADTS（N-エチル-N-スルホプロピル-3-メトキシアニリン），MOUS（N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン），DA-67（Sodium 10-(carboxymethylaminocarbonyl)-3,7-bis(dimethylamino) phenothiazine）（DOJINDO Laboratories）。酵素は，プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP），キサントキシダーゼ（XOD），ペルオキシダーゼ（POD）（Toyobo）を使用した。吸着剤として，Wakogel® C-300（SiO₂）（形状：全多孔性破碎型，粒径：45～75 μm），Wakosil® 75（形状：球状，粒径：45～105 μm），Dowex™ 50Wx8（H⁺），DOWEX™ 1x8（Cl⁻），Wakogel® 50（エンドキャッピング済み，粒径：40～63 μm）PRS（プロピルスルホン酸），SAX（トリメチルアミノプロピル修飾シリカゲル：（SiO₂）-R₃NH₃⁺），DEA（ジエチルアミノプロピル），フェニル，シクロヘキシル，C₂（エチル），C₈（オクチル），Accubond ODS-C₁₈を使用した。無電荷樹脂として，Amberlite® XAD-1180N（粒径：20～60 mesh），Amberlite® XAD-2（粒径：20～60 mesh），Amberlite® XAD-4（粒径：20～60 mesh），Amberlite® XAD-7HP（粒径：20～60 mesh），Amberlite® DAX-8（粒径：20～60 mesh）を使用した。各吸着剤は，水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。樹脂は，乳鉢で粉碎した後，沈降法で粒径を揃え室温で乾燥させたものを使用した。また，SiO₂に界面活性剤をコーティングし機能性吸着剤として使用した。（SiO₂）-Zeph⁺：SiO₂（Wakogel® C-300）100 mgを0.02 mM Zeph⁺溶液10 mLに2時間浸漬させ，ろ過し蒸留水で洗浄後，乾燥させた。（SiO₂）-CTAB：SiO₂（Wakogel® C-300）100 mgを0.02 mM CTAB溶液10 mLに2時間浸漬させ，ろ過し蒸留水で洗浄後，乾燥させた。（SiO₂）-DS⁻：（SiO₂）-Zeph⁺100 mgを0.01 mM ドデシル硫酸ナトリウム溶液10 mLに2時間浸漬させ，ろ過し蒸留水で洗浄後，乾燥させた。

5.2.1.2. 確立した測定方法

PO₄³⁻の確定した簡易分析操作を示した。

1.5 mL マイクロチューブに 14.2 mg のクエン酸/クエン酸三ナトリウム緩衝液（最終溶液 pH は 7.4）、0.3 mg のイノシン、0.4 mg の 4-アミノアンチピリン、0.02 mg の TOPS、0.01 mg PNP (546 U/L)、0.05 mg XOD (712 U/L)、0.02 mg POD (685 U/L) の 15 mg の混合試薬と 5 mg の吸着微粒子 (XAD-7HP) を充填した。そこへ試料 1 mL を添加し、マイクロチューブを 30 秒間軽く振り混ぜ沈積した粒子の色調から PO₄³⁻ の濃度を求めた。

5.2.2. 結果と考察

5.2.2.1. 水相の酵素量と呈色反応時間

酵素量を変えて呈色速度の検討をした。それぞれの酵素量を変えて、試料水 (PO₄³⁻-P, 0.1 mg/L) を 5 分間呈色させ吸光度を比較したところ発色反応速度は酵素量に依存した。そこで、本研究では Fig. 5.2.2.1-1 に示すように、5 分以内に着色を完了するために、酵素量を PNP : 546 U/L, XOD : 712 U/L, POD : 685 U/L に設定した。

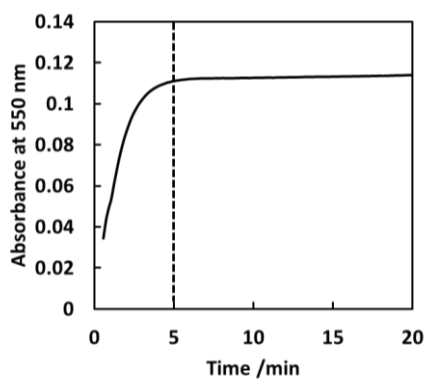


Fig. 5.2.2.1-1 時間ごとの着色の様子 (PO₄³⁻-P : 0.1 mg/L, pH : 7.4)

5.2.2.2. 呈色反応へ与える pH の影響

酵素活性は水相の pH にも影響を受けるため、最適な pH 条件を検討した。試料水 ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, 0.1 mg/L) を混合試薬中のクエン酸とクエン酸三ナトリウムの比率を変えて pH を変化させ呈色させ吸光度を測定した。pH は吸光度測定後 pH メーターを用いて測定した。その結果を Fig. 5.2.2.2-1 に示す。この結果より、pH 6.5~8 の間で呈色し、pH 7.4 が最も感度が高かった。3 種類の酵素の酵素活性を Toyobo の製品表[12-14]を参考に比較すると、各酵素の活性範囲で呈色していることが分かった。そこで、pH 7.4 となるようにクエン酸・クエン酸三ナトリウム緩衝剤 (0.001 M : 0.1 M) を調整した。

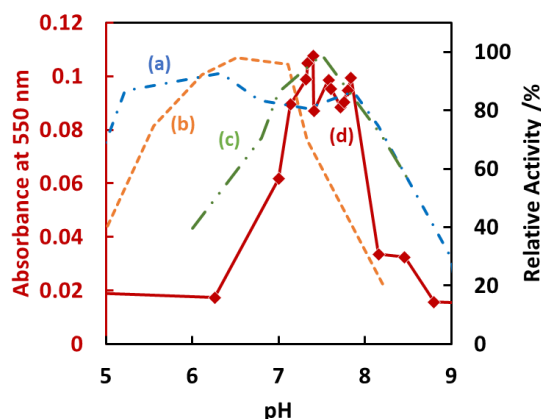


Fig. 5.2.2.2-1 pH ごとの各酵素の活性

(a) PNP, (b) POD, (c) XOD (Toyobo の各酵素活性に報告された製品表に基づく) (d) PO_4^{3-} を酵素反応で呈色した時の pH の影響 (呈色条件 ; $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (0.1 mg/L) と TOPS (0.07 mM) を含む試料溶液 (クエン酸バッファー : pH 7.4) を各酵素と混合し (PNP : 546 U/L, XOD : 712 U/L, POD : 685 U/L), 吸光度 (550 nm) を測定

5.2.2.3. 反応温度の影響

酵素活性は呈色時の温度にも影響を受ける可能性がある。そこで採水時の試料水の温度を約 10~40 °C と変化させて呈色時間に影響が出るかをみた。その結果を Fig. 5.2.2.3-1 に示す。Fig. 5.2.2.3-1 より、約 10~40 °C の範囲では呈色反応速度は一定であった。そのため、一般的な河川水などの温度は呈色速度に及ぼす影響は少ないと考えられる。

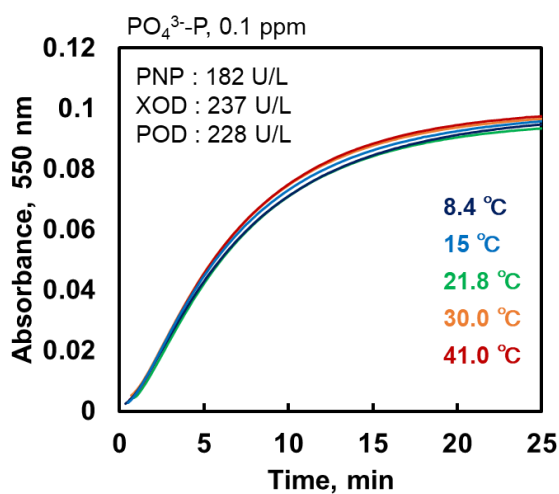


Fig. 5.2.2.3-1 試料水温度ごとの呈色反応速度

5.2.2.4. 呈色試薬の選択

酵素法は、4-AAと反応する酸化試薬（トリンダー試薬）を変えることで、検出波長や感度を変えることができる。分散微粒子抽出法へ応用する際、どの酸化試薬が適しているか検討した。

酸化試薬として、トリンダー試薬（TOPS, ADPS, MAOS）、ロイコ色素（DA-67）の4種類を用いて検討した。試料水（PO₄³⁻-P, 0.17 mg/L）1 mLを混合試薬 30 mgと反応させ5分間放置し、スペクトルを測定し、各試薬のスペクトルを比較した。その結果を Fig. 5.2.2.4-1 (a)に示す。この結果より、各試薬で極大吸収波長が異なり、TOPSとDA-67の感度が高かった。そこで、TOPSとDA-67で反応した際のブランクを比較した結果を Fig. 5.2.2.4-1 (b)に示す。その結果、DA-67はブランクでも高い吸光度を示すことが分かった。そこで、ブランクが低く、DA-67のように反応停止剤（還元剤：アスコルビン酸）を必要としないため、TOPSを最適な呈色試薬とした。

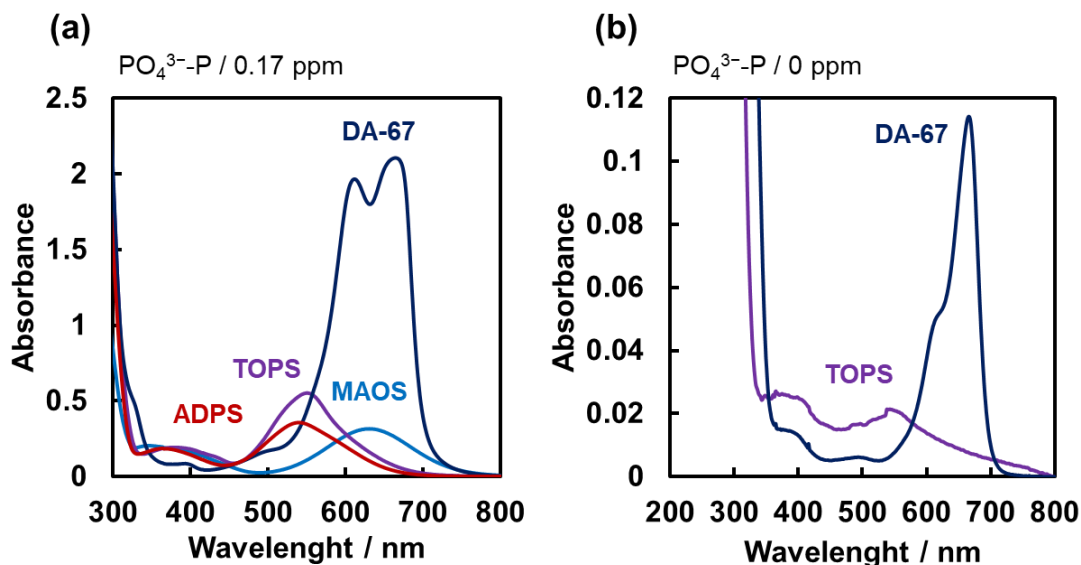


Fig. 5.2.2.4-1 呈色試薬の（トリンダー試薬，酸化試薬）のスペクトルの比較
 (a) $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 添加時の呈色試薬（トリンダー試薬，酸化試薬）のスペクトル，(b) $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ を添加なしの場合の TOPS と DA-67 のスペクトル（赤線：ADPS，青線：MAOS，紫色：TOPS，紺色：DA-67）

5.2.2.5. 吸着剤微粒子の選択

生成した色素（TOPS 4-AA-誘導体）は，双性イオンであるため，異なる性状（極性及び表面電荷）の種々の微粒子を用いて最適なものを検討した。

微粒子として SiO_2 ベース 13 種，樹脂ベース 7 種，陽イオン交換体，陰イオン交換体，中性疎水性吸着剤，親水性吸着剤など，20 の異なる粒子材料（Table. 5.2.2.5-1）を対象とした。Amberlite[®] の樹脂は乳鉢で軽く粉碎し粒径を $<1000 \mu\text{m}$ とした。試料水（ $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ， 0.2 mg/L ） 1 mL へ微粒子をそれぞれ 10 mg 添加し，30 秒間攪拌した後，遠心分離後，上澄み液の吸光度を測定した。微粒子添加前の吸光度を初濃度として，捕集率を算出した。この結果より，電荷をもつ微粒子の捕集率は低く，中性の疎水性および親水性吸着剤で高い捕集率が得られた。その中でも，XAD-1180N，XAD-2 の無極性の微粒子が最も捕集率が高かった。しかし，水中に分散したまま沈殿せず，水相との分離が困難であった。そこで，水への分散性と沈降性を考慮して，捕集率が良好な微孔性樹脂である XAD-7HP を選択した。

Table. 5.2.2.5-1 各微粒子の種類ごとの TOPS の捕集率の比較

微粒子；SiO₂系 13 種，樹脂系 7 種（Amberlite® (XAD-, DAX-)樹脂は乳鉢で軽く粉碎し，粒子サイズを<1000 μm として使用した）

吸着条件；微粒子量：10 mg，試料量：1 mL，PO₄³⁻-P：0.2 mg/L（30 秒間攪拌し，遠心分離後，上澄み液の吸光度を測定した。水相の吸光度から捕集率を算出した。）

Adsorbent Fine particles	Recovery /%	Remarks
(SiO ₂)	30.8	
(SiO ₂) (spherical)	35.0	
(SiO ₂)-C ₃ H ₆ SO ₃ ⁻	9.4	
(SiO ₂)-C ₃ H ₆ N ⁺ (CH ₃) ₃	0.2	
(SiO ₂)-C ₂ H ₄ N(R) ₂	15.0	
DOWEX™ 50Wx8	11.6	
DOWEX™ Wx8	6.6	
(SiO ₂)-C ₂	8.0	no sedimentation
(SiO ₂)-C ₈	4.1	
(SiO ₂)-C ₁₈	27.5	
(SiO ₂)-phenyl	29.7	
(SiO ₂)-cyclohexyl	4.8	
XAD-1180N	73.4	
XAD-2	43.0	
XAD-4	39.9	
XAD-7HP	35.1	used in this study
DAX-8	28.6	
(SiO ₂)-DDAB ⁺	18.7	coated with surfactant
(SiO ₂)-Zeph ⁺	17.4	
(SiO ₂)-SD ⁻	29.6	

n=3

5.2.2.6. 吸着剤微粒子の粒子サイズによる捕集能の性質

吸着剤の粒径は，目的成分由来の着色生成物の回収効率と沈降速度の両方を制御する重要な要素である。XAD-7HP（20～60 mesh）を乳鉢で粉碎し，沈降法を使用して種々のサイズ（0.88 ± 0.20，0.57 ± 0.15，および 0.36 ± 0.10 mm）の微粒子を得た。サイズが小さい粒子は回収効率が高いが，沈降速度が遅くなるため（Fig. 5.2.2.6-1），粒子サイズを 0.36 ± 0.10 mm に設定し，分析時間を 2 分に設定した。この条件での 4-AA 誘導体の捕集率は 74%を超えた。

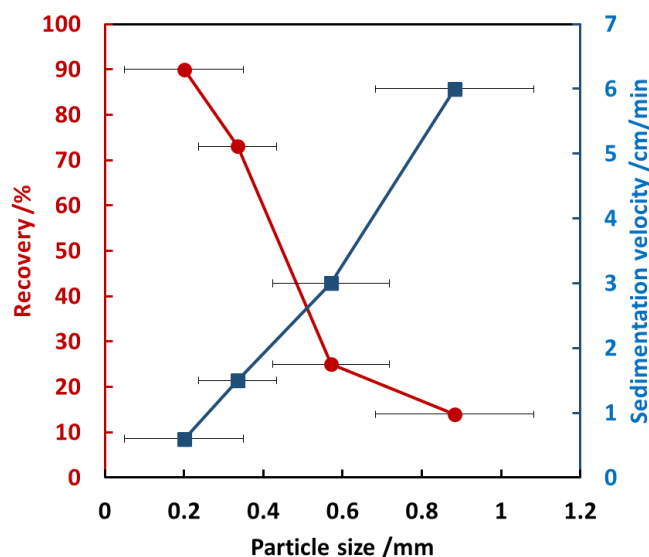


Fig. 5.2.2.6-1 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ の捕集率と沈降速度に対する微粒子サイズの影響

吸着条件； $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ：0.04 mg/L，微粒子量：3 mg，試料量：1 mL

捕集率は，水相の吸光度から算出した。沈降速度は，メスシリンダー内の垂直沈降速度を測定した。

5.2.2.7. 吸着剤微粒子の添加量ごとの測定感度と定量範囲

Fig. 5.2.2.7-1 に，本法を使用した PO_4^{3-} 測定の結果を示す。写真から，サブ $\mu\text{g/L}$ (Fig. 5.2.2.7-1 (A)) および $\mu\text{g/L}$ レベル (Fig. 5.2.2.7-1 (B)) の PO_4^{3-} を目視で簡単に判断できることが分かる。添加量が異なる XAD-7HP (サイズ, $0.36 \pm 0.10 \text{ mm}$) の $0 \sim 0.01 \text{ mg/L}$ の範囲の PO_4^{3-} 濃度に対する Gray 値の依存性を Fig. 5.2.2.7-1 (C) に示す。吸着微粒子 3 mg から得られた検量線の傾きは 5 mg の場合で得られた傾きの 2 倍であった (Fig. 5.2.2.7-1 (C-a))。算出した検出限界 ($3\sigma_B$) は 0.005 mg/L であった。この結果は，提案手法の感度が吸着微粒子のサイズと量によって制御できることを示している。3 mg の微粒子の場合，Fig. 5.2.2.7-1 (D) に示すように， $2 \sim 10 \mu\text{g/L}$ の範囲で Gray 値と PO_4^{3-} 濃度間に線形関係が得られた。5 mg の微粒子の場合，直線関係は $2 \sim 100 \mu\text{g/L}$ の範囲で得られた (Fig. 5.2.2.7-1 (C-b))。本法は従来のリン酸塩測定法と比較して，PAD で測定するモリブデンブルー法[15]や水相で測定する酵素法 (トリンダー試薬) [16] よりも感度が高く，マラカイトグリーン法[17]と同程度の感度を持つ。

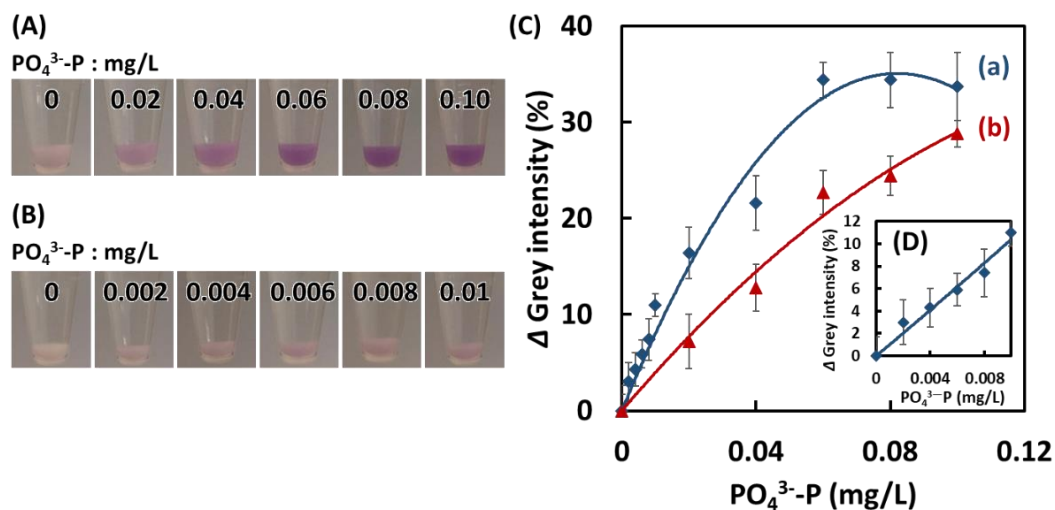


Fig. 5.2.2.7-1 PO_4^{3-} の測定

(A), (B) PO_4^{3-} 濃度ごとの微粒子の色変化, (C) (a) 3 mg, (b) 5 mg を添加した時の検量線, (D) 3 mg 添加時の PO_4^{3-} 低濃度の検量線

5.2.2.8. 妨害成分の影響

本法への妨害成分の影響を検討した。また、昨今は排水規制の拡充に伴い海水の貧栄養が問題となっている。そこで、海水への適用が可能であるかを検証するために NaCl を用いた。NaCl の濃度を変えて試料水 (PO_4^{3-} , 0.05 mg/L) を呈色させ、XAD-7HP (0.36 ± 0.10 mm) 5 mg へ吸着させた結果を Fig. 5.2.2.8-1 (a) に示す。Fig. 5.2.2.8-1 (b) に Gray 値をプロットした結果を示す。これらの結果より、NaCl が 0.05 M までは、Gray 値が 2~3% 程度の減少で測定することができた。一般的な海水濃度 (1~1.5 M) では、呈色反応も阻害され測定が困難であるが、NaCl 濃度が 0.1 M 以下の淡水や汽水では測定可能であると考えられる。XAD-7HP は主にフミン酸などの溶存有機成分の分離に用いられる樹脂であるため、吸着を妨害する可能性がある。そこで、溶存有機成分 (フミン酸) 共存下での影響をみた。フミン酸の濃度を変えて試料水 (PO_4^{3-} , 0.1 mg/L) を呈色させ、XAD-7HP (0.36 ± 0.10 mm) 5 mg へ吸着させた結果を Fig. 5.2.2.8-2 (a) に示す。Fig. 5.2.2.8-2 (b) に Gray 値をプロットした結果を示す。これらの結果より、フミン酸が 40 mg/L までは、Gray 値が 2~3% 程度の減少で測定することができた。国内の河川・湖沼中に溶存している濃度は 10~20 mg/L 程度であることから、環境水で測定することができる。

界面活性剤をコーティングした XAD-7HP は色素の捕集剤に多く使用されている。そこで、界面活性剤存在下で目的成分の吸着に影響が出るかをみた。界面活性剤としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いた。SDS の濃度を変えて試料水 (PO_4^{3-} , 0.1 mg/L) を

呈色させ、XAD-7HP (0.36±0.10 mm) 5 mg へ吸着させた結果を Fig. 5.2.2.8-3 (a)に示す。Fig. 5.2.2.8-3 (b)に Gray 値をプロットした結果を示す。この結果より、検討した SDS 濃度では Gray 値の影響なしに測定できる。SDS (陰イオン界面活性剤) の環境基準値は 0.2 mg/L であるため、環境水の測定は可能であると考えられる。

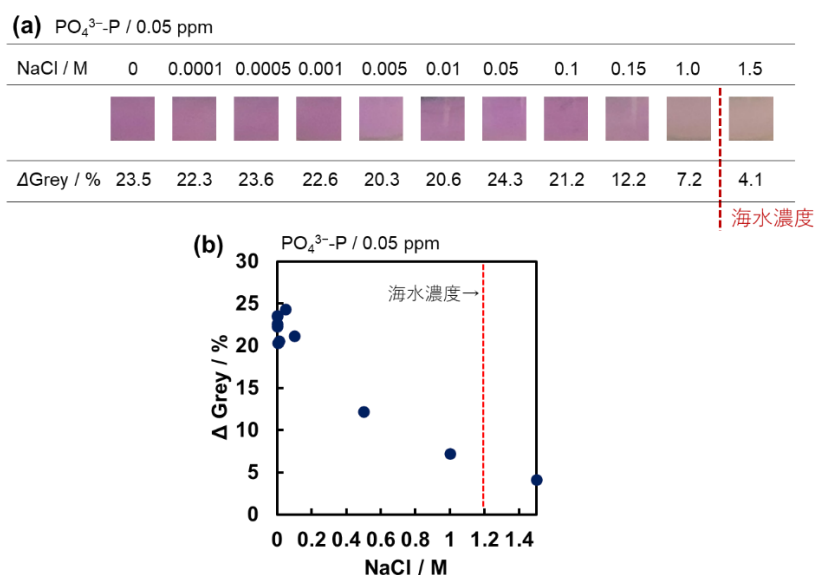


Fig. 5.2.2.8-1 NaCl 濃度を変えて呈色・吸着させた微粒子の色調変化
(a) 沈積した微粒子の写真, (b) 沈積した微粒子の Gray 値と NaCl 濃度の関係

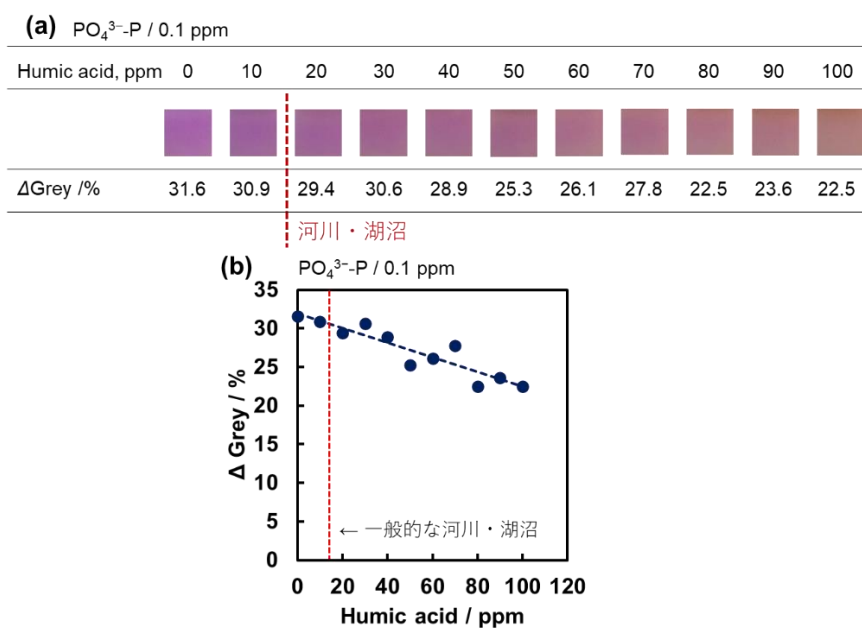


Fig. 5.2.2.8-2 フミン酸濃度を変えて呈色・吸着させた微粒子の色調変化

(a) 沈積した微粒子の写真, (b) 沈積した微粒子の Gray 値とフミン酸濃度の関係

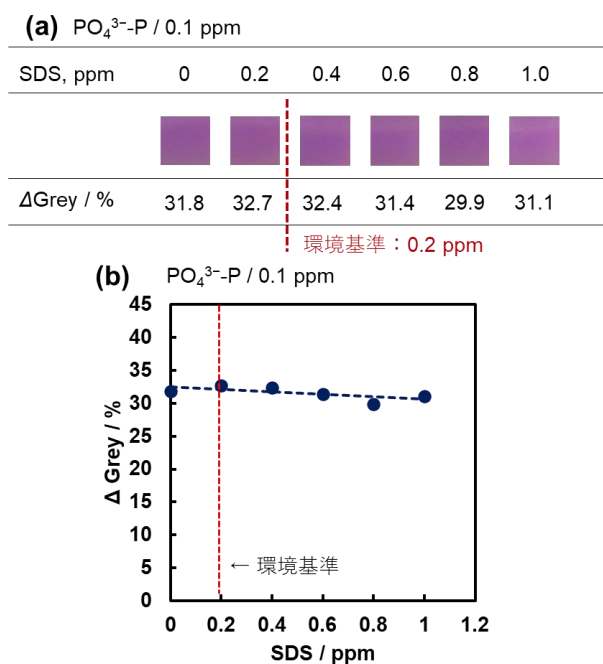


Fig. 5.2.2.8-3 SDS 濃度を変えて呈色・吸着させた微粒子の色調変化

(a) 沈積した微粒子の写真, (b) 沈積した微粒子の Gray 値と SDS 濃度の関係

5.2.3. 実試料への応用

5.2.3.1. 実試料への応用, 標準添加, 比較

本法を用いて, 富山大学付近の小河川(古川)の試料水を測定し, モリブデン青吸光光度法と比較した。この結果を Table. 5.2.2.8-1 示す。モリブデン青吸光光度法と良く一致し, 河川水中の PO_4^{3-} を測定できた。

Table. 5.2.2.8-1 河川中の PO_4^{3-} リン酸の測定

Sample	This method	Molybdenum blue method
River water	0.04 ppm	$0.041 \pm 0.003 \text{ ppm}$
	(pH 6.51, EC: 154.1 $\mu\text{S/cm}$)	n=3

5.3 まとめ

酵素法を用いた、強酸を使用しない、 PO_4^{3-} の高感度な簡易分析比色法を開発した。本法では、TOPSで呈色させた双性イオンをXAD-7HP (0.36 ± 0.10 mm)へ吸着させることで、溶液と比べ約10倍の高感度化を達成した。環境水中のリン酸を数十 $\mu\text{g/L}$ レベルで測定できた。

本法の開発にあたって、微粒子のサイズと添加量が感度に影響を与えることを明確に示した。そのため分散微粒子抽出法は、正確な測定を行うために、微粒子のサイズの均一化や正確な量の添加が必要となる。しかし、微粒子のサイズや添加量を調整することで測定感度の調整が可能な方法である。

5.4. 参考文献

- [1] 栢森 裕三, 片山 善章, *Medical Technology*, (1983)
- [2] M. Ornatska, E. Sharpe, D. Andreescu, S. Andreescu, *Analytical Chemistry*, (2011), 83, 4273-4280.
<https://doi.org/10.1021/ac200697y>
- [3] S. M. Zakir Hossain, Roger E. Luckham, Anne Marie Smith, Julie M. Lebert, Lauren M. Davies, Robert H. Pelton, Carlos D. M. Filipe, John D. Brennan, *Analytical Chemistry*, (2009), 81, 5474-5483.
<https://doi.org/10.1021/ac900660p>
- [4] W. Dungchai, O. Chailapakul, C. S. Henry, *Analytica Chimica Acta*, (2010), 674, 227-233.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.019>
- [5] E. Morita, E. Nakamura, *Anal. Sci.*, (2011), 27, 489-492. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.489>
- [6] K. Isobe, H. Yamada, Y. Soejima, S. Otsuji, *Clin. Biochem.*, (1987), 20, 157-161.
[https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(87\)80113-3](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(87)80113-3)
- [7] P. Mohammadnejad, S. S. Asl, S. Aminzadeh, K. Haghbeen, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2020), 229, 117897 <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117897>
- [8] R. W. Spayd, B. Bruschi, B. A. Burdick, G. M. Dappen, J. N. Elkenberry, T. W. Esders, J. Figueras, C. T. Goodhue, D. D. LaRossa, R. W. Nelson, R. N. Rand, W. Tai-Wing, *Clinical Chemistry*, (1978), 24, 1343-1350. <https://doi.org/10.1093/clinchem/24.8.1343>
- [9] 奥 修, 吸光光度法ノウハウ: ケイ酸・リン酸・硝酸塩の定量分析, (2002)
- [10] K. Matumoto, K. Sakai, *The Chemical Society of Japan*, (1987)
- [11] S. Taguchi, E. Itooka, K. Masuyama, I. Kasahara, K. Goto, *Talanta*, (1985), 32, 391-394.
[https://doi.org/10.1016/0039-9140\(85\)80104-1](https://doi.org/10.1016/0039-9140(85)80104-1)
- [12] TOYOBO ENZYMES (Diagnostic Reagent Grade) PURINE-NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE from Microorganism PNP-311

- https://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/enzyme/enzyme_list/PNP_311/index.html
- [13] TOYOBO ENZYMES (Diagnostic Reagent Grade) PEROXIDASE from Horseradish PEO-131/301/302
https://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/enzyme/enzyme_list/PEO_131_301_302/index.html
- [14] TOYOBO ENZYMES (Diagnostic Reagent Grade) XANTHINE OXIDASE from Microorganism XTO-212 https://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/enzyme/enzyme_list/XTO_212/index.html
- [15] J. M. Racicot, T. L. Mako, A. Olivelli, M. Levine, *Sensors*, (2020), 20, 2766.
<https://doi.org/10.3390/S20102766>
- [16] Pack Test Phosphate (Low Range), Kyoritsu Chemical-Check Lab., https://kyoritsu-lab.co.jp/products/wak_po4_d (Accessed September 28, 2022)
- [17] A. Guilfoyle, M. J. Maher, M. Rapp, R. Clarke, S. Harrop, M. Jormakka, *The EMBO Journal*, (2009), 28, 2677-2685. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.208>

第6章 6価クロム (Cr(VI)) の簡易分析法の開発

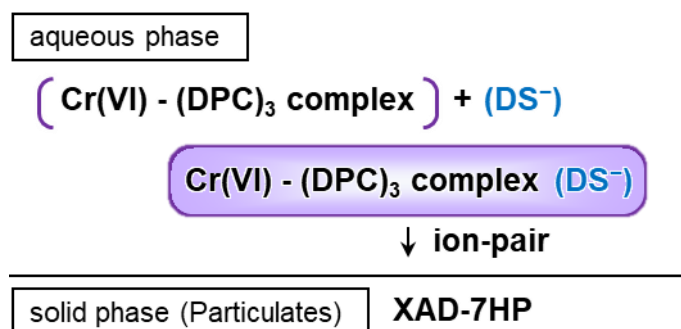
—微粒子への抽出種の推定—

6.1 はじめに

本研究では、金属錯体と対イオンが凝集体を形成し、効果的に固相に抽出されるイオンペア抽出に着目し、分散型と組み合わせることで、Cr(VI)の高感度で簡便な方法を提案した。そして、イオン対固相抽出系の平衡と吸着種の化学量論をイオン対溶媒抽出に従って議論した。

6.1.1. 本研究の捕集形態について

本研究では、ジフェニルカルバジド吸光光度法を用いて Cr(VI)を測定した。本法の分析フローと呈色成分の吸着の仕組みを示す (Scheme 6.1.1.-1)。Cr(VI)をジフェニルカルバジド (DPC) と反応させるとキレート錯体 $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ (紫色) が生成する。正電荷を持つ $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体に対イオンとしてドデシル硫酸ナトリウム (SD^-) を添加しイオン対を形成させ、微孔性樹脂である XAD-7HP へ疎水性相互作用によって捕集する。



Scheme 6.1.1.-1 $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体と対イオンのドデシル硫酸ナトリウム (SD^-) の XAD-7HP へのイオン対抽出のモデル

6.1.2. Cr(VI)について

Cr の用途は多様であり、顔料、なめし剤、染料、固定剤として利用されており、めっき産業や鋳業からの廃棄物と共に環境中に排出されている[1-6]。一方、Cr(VI)は毒性や発がん性が高く、生態系や人の健康に非常に有害[7]であるため、環境水や飲料水に対して基準値 (<0.05 mg/L) が設定されている[8-10]。環境水中の Cr(VI)は酸化しやすく、有機物共存下では直ぐに Cr(III)に還元されこともあるため、採水直後に Cr(VI)の測定をする必要がある。そのため、微量の Cr(VI)を現場で測定するには、感度が高いだけでなく、迅速性も重要である[11-12]。

Cr(VI)の主な分析方法には Cr(VI)と錯体を形成するジフェニルカルバジド (DPC) [13, 14]が使用されている。分光光度法[15-18]、液体クロマトグラフィー[19]、原子吸光分光光度法[20]、および、フローインジェクション[21]などの多くの機器による定量分析が報告されている。また、現場での分析に適した紙を基盤とした分析方法 (LOD : 30 mg/L) も報告されている[22-25]。Cr(VI)は、イオン交換や吸着剤表面での錯体形成などの技術を用いて効率的に固相に捕集されている[4, 26-27]。その吸着性能を利用してイオン交換樹脂などの吸着剤を充填したカラムでの Cr(VI)の分離・濃縮が測定感度を向上させるための前処理として適用されている[28-31]。また、[Cr-(DPC)₃] 錯体を陽イオン交換樹脂に集め、カラムを直接比色測定し、固相の色強度を分光光度計で測定するイオン交換体比色法も提案されている[32-34]。均一液液抽出を利用して少量の有機溶媒中に [Cr-(DPC)₃] 錯体を抽出して高感度に測定する方法も報告され、[Cr-(DPC)₃] 錯体を利用した比色法が利用されている。

6.2. 分析法の開発

6.2.1. 実験

6.2.1.1. 装置と試薬

2.4.3.1.1. 装置と試薬に実験に用いた装置及び画像解析ソフトを記載した。1-5-ジフェニルカルバジド、二クロム酸カリウム、アミド硫酸、塩化ナトリウム、アセトン、硫酸、水酸化ナトリウム (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。試薬は、特級を使用し、全て超純水を用いて調製した。対イオンとして、ラウリン酸ナトリウム、(CH₃(CH₂)₁₀COONa)、1-オクタンスルホン酸ナトリウム (CH₃(CH₂)₇SO₃Na)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (C₁₈H₂₉SO₃Na)、ビス[(2-エチルヘキシル)オキシ]-1,4-ジオキシ-2-ブタンスルホン酸ナトリウム

($C_{20}H_{37}O_7SNa$), 1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム ($C_{10}H_7O_3SNa$), 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウム ($C_8H_9O_3SNa$), テトラフェニルホウ酸ナトリウム ($C_{24}H_{20}BNa$) (Tokyo Chemical Industry Co, Ltd.)。吸着剤として, Wakogel[®] 50 PRS ($(SiO_2)-C_3H_6SO_3^-$) (形状: 全多孔性破碎型, 粒径: 40~63 μm), DOWEX[™] 50Wx8 (H^+) (200~400 mesh) (FUJIFILM Wako, Ltd.) を使用した。Amberlite[®] XAD-7HP(20~60 mesh)は乳鉢で粉碎し, 沈降法で分級 (0.36 \pm 0.10 mm) した。各吸着剤は, 水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。

6.2.1.2. 確立した測定方法

Cr(VI)の確定した簡易分析操作を示した。

1.5 mL マイクロチューブに 5 mg のアミド硫酸, 1 mg の DPC, 4 mg の塩化ナトリウム, 0.3 mg の DS^- の混合粉末試薬と 5 mg の吸着微粒子(XAD-7HP)を充填した。そこへ試料 1 mL を添加し, マイクロチューブを 30 秒間軽く振り混ぜ沈積した粒子の色調から Cr(VI)の濃度を求めた。

6.2.1.3. 画像測色法

スマートフォンのカメラ機能でマイクロチューブを撮影した。背景を黒にして, 吊るして撮影した。写真をパソコンに転送し, ImageJ のソフトウェアを使用して 8bit の Gray に変換した。マイクロチューブ内に沈積した微粒子を拡大し, Gray 値を測定した。その際, 50 \times 50 pixel の範囲を選択し Gray 値の平均値を求めた。

6.2.2. 結果と考察

本研究では、Cr(VI)の簡易分析法としての確立と [Cr-(DPC)₃] 錯体とドデシル硫酸ナトリウムのイオン対の吸着剤微粒子への抽出挙動を溶媒抽出のモデルを用いて解析をした。

6.2.2.1. 吸着剤微粒子への捕集形の検討

(1) イオン交換を使った捕集形

[Cr-(DPC)₃] 錯体の電荷は吸着剤微粒子を選択する上で重要な要素の 1 つである。Cr(VI)と DPC の錯体の構造と電荷についてはいくつか報告されており、[Cr-(DPC)₃] 錯体は酸性溶液中で正の電荷を持つと報告されている[10, 36, 37]。

そこで、静電吸着を利用したイオン交換で錯体を陽イオン交換体で捕集した。2 種類の陽イオン交換体として、ポリマー型：DOWEX™ 50Wx8 (H⁺)、シリカ型：Wakogel® 50PRS ((SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻)で検討した。Fig. 6.2.2.1.-1 は、(a) DOWEX™ 50Wx8 (H⁺)、及び、(b) (SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻の 10 mg の沈殿物の写真で、[Cr-(DPC)₃] 錯体の収集後である。水相の分光測光法による回収率は、それぞれ76%と57%であった。DOWEX™ 50Wx8 (H⁺)は(SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻よりも高い回収率を示したが、材料自身の色（黄色）が目視および画像比色測定の際に干渉したため、[Cr-(DPC)₃] 錯体の捕集を別の戦略で検討することにした。

	Cr(VI), ppm		Recovery, %
	0	0.1	
(a) DOWEX™ 50Wx8 (10 mg)			76
(b) (SiO ₂)-C ₃ H ₆ SO ₃ ⁻ (10 mg)			57
(c) XAD-7HP (5 mg)			91

Fig. 6.2.2.1.-1 沈積した微粒子の写真と [Cr-(DPC)₃] 錯体の捕集率

(a) DOWEX™ 50Wx8 (H⁺) : 10 mg , (b) (SiO₂)-C₃H₆SO₃⁻ : 10 mg, (c) XAD-7HP (0.36 ± 0.10 mm, 5 mg) 吸着条件 ; 試料量 : 1 mL, 温度 : 20 °C, pH 1.7

6.2.2.2. 吸着剤微粒子の選択

(2) イオン対を使った捕集形

イオン対抽出は、荷電種を効率的に捕集できる 1 つの捕集型である。イオン対溶媒抽出では、通常、非極性溶媒よりも抽出性が高い水不溶性の極性溶媒が選択される。また、メンブラン膜を使用したイオン対 SPE では、ニトロセルロースなどの親水性材料が PTFE などの疎水性材料よりも優れている [38]。そこで、中性親水性素材の吸着剤を検討した。第 5 章の PO_4^{3-} 測定では、XAD-7HP が双性イオンの捕集に優れていることがわかった。そこで、XAD-7HP を使って $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体の捕集能を評価した。1 mL の試料溶液中での 5 mg の XAD-7HP は、1 mM DS^- の存在下で $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体を 91% 以上回収した (Fig. 6.2.2.2.-1 (c))。

6.2.2.3. 対イオンの選択

最適な対イオンを選択するために、極性の異なる 8 種類の有機陰イオンを用いて比較した (Fig. 6.2.2.3.-1 (a))。Cr(VI) 0.06 mg/L の $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体に 0.5 mM の各有機陰イオン溶液を混合し 5 mg の XAD-7HP を添加し、攪拌した後、水相の吸光度を測定し、捕集率を算出した。Fig. 6.2.2.3.-1 (b) に捕集率 (%) と有機陰イオンの固有抽出定数の関係を示した。個々の定数は、イオン対溶媒抽出平衡に関する研究で、過去に本研究室で提案された溶媒のパラメーターを示す定数である [39-41]。簡単に説明すると、イオン対抽出システムの抽出定数 K_{ex} は、Eq. 1 に従って、3 つの独立した定数 (個々の抽出定数)、 K_e 、 K_a および K_s で構成できると仮定する。

$$\log K_{ex} = \log K_e + \log K_a + \log K_s \quad \text{Eq. 1}$$

ここで、下付き文字の c, a および s は、それぞれの陽イオン、陰イオンおよび溶媒を表す。陽イオン、陰イオンおよび溶媒の $\log K$ 値は、定数として $K_{\text{Ph}_4\text{As}^+} = K_{\text{Ph}_4\text{B}^-}$ 、 $K_{\text{benzene}} = 1.0$ を割り当てることで、 $\log K_{ex}$ を実験値から計算した。固有抽出定数の値は、陽イオン、陰イオンおよび溶媒が未知の組み合わせの場合に対して K 値を推定する際やイオンの抽出の可能性や溶媒の抽出力を推定するときには有用である。固有抽出定数の値は実験結果から割り当てられ、定数の大きいイオンほど対イオンとしての抽出性が高い。Fig. 6.2.2.3.-1 (b) より、固有抽出定数が増加するにつれて捕集率が増加することが分かった。テトラフェニルホウ酸イオン (Fig. 6.2.2.3.-1 (b) の No.8) は、最も大きな定数を持つが、十分な捕集率が得られなかった。この場合、微粒子の色が紫から青に変化した。この現象はおそらく $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体の化学形態の変化が原因であると考えられる。陰イオンによる色変化

の詳細は今のところ不明である。また、1-オクタンスルホン酸イオン (Fig. 6.2.2.3.-1(b)の No.2) の場合、 $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体溶液に添加すると沈殿物が生成した。そのため、優れた捕集能力、水への溶解性、粒子の色の安定性を考慮し、ドデシル硫酸イオン(SD^-)を選択した。

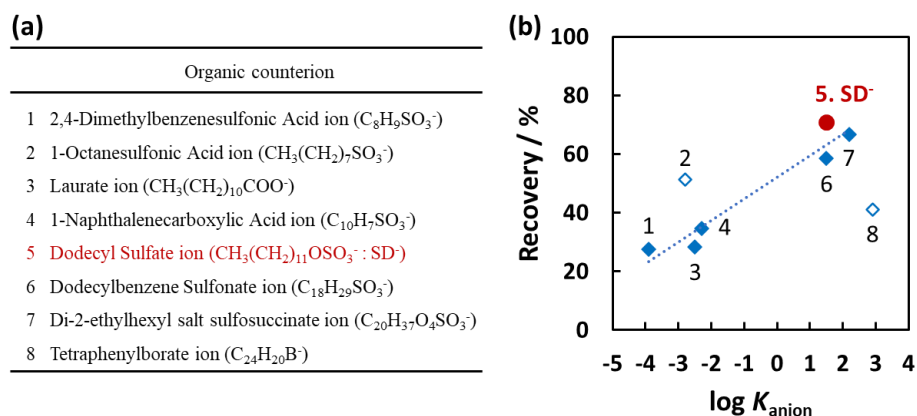


Fig. 6.2.2.3.-1 対イオンの化学的性質と錯体の捕集

(a) 極性の異なる有機陰イオンの表, (b) 捕集率 (%) と有機イオンの個々の抽出定数 (K_{anion}) の関係

吸着条件; Cr(VI) : 0.06 mg/L, 対イオン濃度 : 0.5 mM, 微粒子(XAD-7HP) : 5 mg (錯体の捕集率は、水相の吸光度から算出した。)

6.2.2.4. 対イオンの濃度の選択

ドデシル硫酸イオン(SD^-)の最適な添加濃度を調べた。Fig. 6.2.2.4.-1に Cr(VI)1 mg/L の $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体の捕集に対する SD^- 濃度ごとの結果を示した。DS⁻濃度の増加に伴い、捕集率が増加した (青線)。また、捕集率の上昇に伴って沈積した微粒子の色強度 (Gray 値) も上昇した (赤線)。DS⁻濃度が 0.5 mM 以上で 80%以上の捕集率が得られた。本研究では、 $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体を約 90%捕集した 1 mM 以上の SD^- 濃度を最適とした。

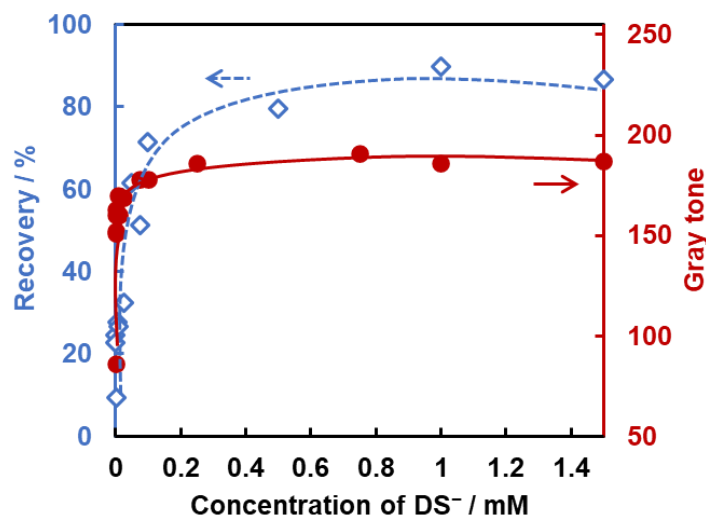


Fig. 6.2.2.4.-1 沈積した微粒子の色変化を錯体の捕集に対する DS⁻濃度の影響

6.2.2.5. 呈色試薬の濃度と pH の選択

[Cr-(DPC)₃] 錯体の形成には、従来法の DPC 濃度と pH が最適であった。液体の酸性試薬は現場での利用を考えると使用が困難なことから粉末試薬であるアミド硫酸を用いて pH を調整した。Fig. 6.2.2.5.-1 は、DS⁻の存在下で [Cr-(DPC)₃] 錯体の pH ごとの捕集率を示した。その結果、[Cr-(DPC)₃] 錯体の捕集に最適な pH は、[Cr-(DPC)₃] 錯体の形成と同じ pH 1.7 であった。捕集率と pH の関係は、後で固相抽出 (SPE) システムの化学量論を推定する際にも用いた。

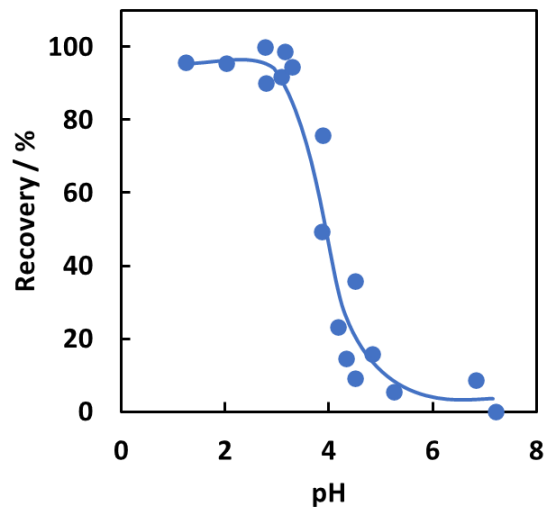


Fig. 6.2.2.5.-1 pH ごとの吸着挙動

吸着条件；Cr(VI)：1 mg/L，試料量：1 mL，微粒子（XAD-7HP）5 mg，水温：20 °C（錯体は pH 1.7 で形成し，微粒子の添加前に pH を 1.0～12.0 に調整した。）

6.2.2.6. 定量範囲

Fig. 6.2.2.6.-1 (a)に，0～2.0 mg/L の Cr(VI)のマイクロチューブの写真を示した。微粒子なしでは 0.1 mg/L 未満の Cr(VI)を目視や画像解析で測定することは困難であった。微粒子を添加し，沈積した微粒子（固相）の色調の強度を ImageJ のソフトウェアで測定した（Fig. 6.2.2.6.-1 (b)）。画像解析で Red，Green，Blue，Gray の値を算出した。[Cr-(DPC)₃] 錯体の濃度変化は Green 値が最も感度が高かった。Red，Green，Blue のそれぞれの色強度の比を算出したところ正確な結果が得られたため，Green/Blue 値を測定値として選択した。Fig. 6.2.2.6.-1 (c)に示すように，0.002～0.1 mg/L で線形検量線が得られた。検出限界は 3.4 µg/L (3σ_B) であった。本法の感度は微粒子を添加しない溶液の画像解析の結果よりも約 5 倍高感度であった。また，水質基準 (0.02 mg/L) よりも低濃度の Cr(VI)を測定することができた。

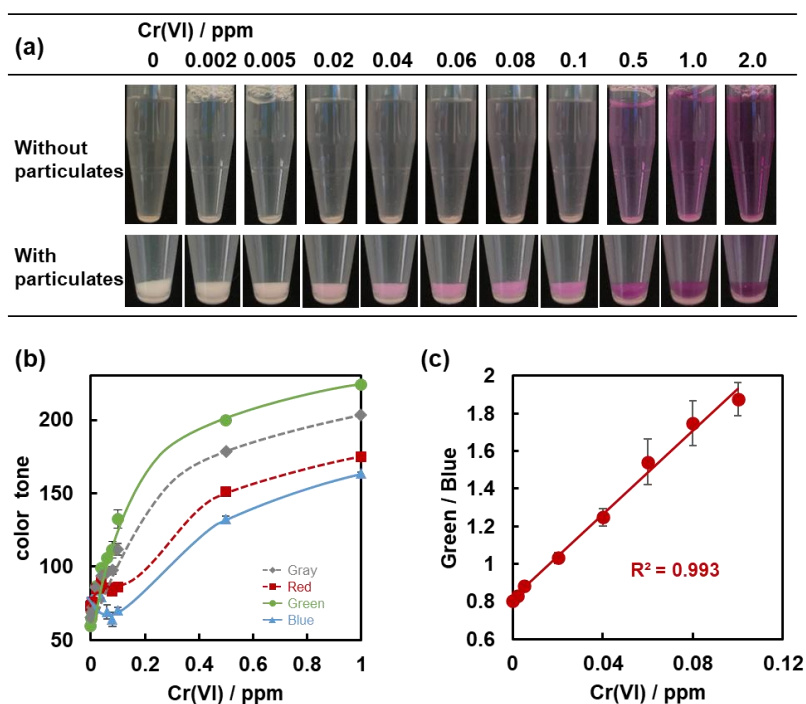


Fig. 6.2.2.6.-1 Cr(VI)濃度ごとの写真と画像解析で得られた検量線

6.2.3. 実試料への応用

6.2.3.1. 模擬排水への適用

めっき廃水と皮なめし廃水を想定した Cr(III)、COD_{Mn} などの組成の異なる 3 種類の模擬排水を用いた (Table. 6.2.3.1.-1)。異なる濃度で添加された Cr(VI)の回収率は、提案された方法によって決定されました (Table. 6.2.3.1.-2)。その結果、高濃度の Cr(III)、COD_{Mn} など存在下でも、添加した Cr(VI)が±10%以内の誤差で測定できた。

Table. 6.2.3.1.-1 模擬排水の組成 (COD_{Mn}: クエン酸ナトリウム)

Simulated drainage	Composition	Conc./ mg/L
1 (pH=3.2)	Cr(III)	0.5
	COD _{Mn}	100.0
	Cd ²⁺	0.1
2 (pH=7.3)	Cr(III)	170.0
	COD _{Mn}	950.0
	Zn ²⁺	0.9
	Co ²⁺	0.8
	NO ₃ ⁻	600.0
	SO ₄ ²⁻	13.0
	Cl ⁻	0.9
3 (pH=12.5)	Cr(III)	50.0
	COD _{Mn}	5000.0

Table. 6.2.3.1.-2 模擬排水に添加した Cr(VI) の添加回収

Simulated drainage	Cr(VI) conc. / mg/L			Recovery / %
	Added	Found		
1	0.000	0.001	± 0.000	-
	0.005	0.007	± 0.001	142
	0.020	0.032	± 0.004	162
	0.060	0.068	± 0.016	113
	0.100	0.102	± 0.055	102
2	0.000	0.000	± 0.000	-
	0.005	0.009	± 0.001	171
	0.020	0.027	± 0.001	135
	0.060	0.058	± 0.001	96
	0.100	0.085	± 0.004	85
3	0.000	0.003	± 0.002	-
	0.005	0.004	± 0.001	70
	0.020	0.024	± 0.002	122
	0.060	0.063	± 0.004	105
	0.100	0.080	± 0.006	80

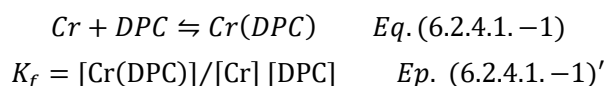
6.2.4. イオン対 SPE と化学量論に関する平衡研究

本研究でイオン対 SPE を選択することで、抽出形の実験が広がった。[Cr-(DPC)₃] 錯体の XAD-7HP への捕集機構を深く理解するために、平衡化学量論を調査した。[Cr-(DPC)₃] 錯体の構造については様々な論文があるが、錯体の電荷についての報告は今のところない。化学量論を検討することで、[Cr-(DPC)₃] 錯体の電荷と SPE メカニズムが明らかになることが期待できる。

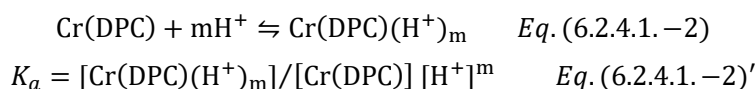
6.2.4.1. イオン対 SPE の平衡モデル

ここで考察した平衡モデルには、[Cr-(DPC)₃] 錯体のプロトン化による m プロトン (H⁺)、イオン対形成による n DS^{-s} および水相と微粒子間のイオン対の分布が含まれる。各平衡過程は、Eq. (6.2.4.1.-1) – Eq. (6.2.4.1.-4) で表す。平衡定数は、それぞれ K_f (錯化)、K_p (プロトン化)、K_{ass} (イオン結合) および K_H (イオン結合の分配, Henry 定数) として表した。

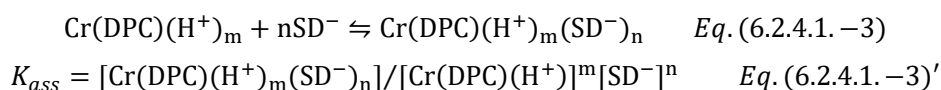
錯体の形成



Protonation



Ion association



Distribution of ion associate

$$\text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{SD}^-)_n \rightleftharpoons (\text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{SD}^-)_n)_{\text{solid}} \quad \text{Eq. (6.2.4.1.-4)}$$

$$K_H = [\text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{SD}^-)_n] / [\text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{SD}^-)_n]_{\text{solid}} \quad \text{Eq. (6.2.4.1.-4)'}$$

By multiplying these equations together except formation step, we obtain Eq. (6.2.4.1.-5).

$$K_a K_{ass} K_H = \{ \text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{SD}^-)_n \}_{\text{solid}} / [\text{Cr(DPC)}][\text{H}^+]^m [\text{SD}^-]^n \quad \text{Eq. (6.2.4.1.-5-1)}$$

$$\{ \text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{SD}^-)_n \}_{\text{solid}} / [\text{Cr(DPC)}] = K_a K_{ass} K_H [\text{H}^+]^m [\text{SD}^-]^n \quad \text{Eq. (6.2.4.1.-5-2)}$$

Whereas,

Whereas, $R(\text{recovery}) = \text{Cr(DPC)}_{\text{solid}} / \text{Cr(DPC)}_{\text{total}}$

$$= \text{Cr(DPC)}_{\text{solid}} / \text{Cr(DPC)}_{\text{total}}$$

$$= \text{Cr(DPC)}_{\text{solid}} / \{ \text{Cr(DPC)}_{\text{solid}} + \text{Cr(DPC)}_{\text{total aq.}} \}$$

And, $\text{Cr(DPC)}_{\text{total aq.}} = \text{Cr(DPC)} + \text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m + \text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{DS}^-)_n$.

Assuming as, $[\text{Cr(DPC)}_3] \gg [\text{Cr(DPC)}_3(\text{H}^+)_m]$, $[\text{Cr(DPC)}_3(\text{H}^+)_m(\text{DS}^-)_n]$, we obtain Eq. (6.2.4.1.-6) and 7.

R

$$= (\text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{SD}^-)_n)_{\text{solid}} / \{ (\text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{SD}^-)_n)_{\text{solid}} + (\text{Cr(DPC)})_{\text{water}} \} \quad \text{Eq. (6.2.4.1.-6)}$$

$$(\text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{SD}^-)_n)_{\text{solid}} / [\text{Cr(DPC)}]_{\text{water}} = R / (1 - R) \quad \text{Eq. (6.2.4.1.-7)}$$

Substituting Eq. (6.2.4.1.-5) into Eq. (6.2.4.1.-7),

$$(\text{Cr(DPC)(H}^+\text{)}_m(\text{SD}^-)_n)_{\text{solid}} / [\text{Cr(DPC)}]_{\text{water}} = R / (1 - R) \quad \text{Eq. (6.2.4.1.-8)}$$

$$\log \{ R / (1 - R) \} = \log K_a K_{ass} K_H + m \log [\text{H}^+] + n \log [\text{SD}^-] \quad \text{Eq. (6.2.4.1.-9)}$$

$[\text{SD}^-]$ を一定にして、さまざまな pH での実験によって $R/(1-R)$ 値を取得すると、Eq. (6.2.4.1.-9) の勾配分析から m 値を推定できる。同様に、一定の pH で、さまざまな $[\text{SD}^-]$

での実験によって n 値を推定できる。

6.2.4.1. 吸着種の分布挙動と組成

チューブ内で $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体を生成 (pH 1.7) させた後、5 mg の XAD-7HP の存在下で pH または $[\text{DS}^-]$ を変化させた。マイクロチューブを 20 °C の恒温槽に設置し、吸着の平衡に達するまで 5 分間穏やかに数回攪拌した。捕集率は、水相の吸光度から算出した。

Fig. 6.2.2.4.-1 に示すように、 $[\text{DS}^-]$ が過剰な条件では、捕集率は pH 3 未満でほぼ一定で、pH 3.5 を超えると減少し、pH 6 を超えるとほぼ捕集しない。Log (1-R)/R と pH の関係を Fig. 6.2.4.1.-1 (a) に示した。その結果、関係の勾配 1.03 (=m) は、1 つの $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体分子に対して 1 つの H^+ が結合していることを示した。pH 1.7 での $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体対 $[\text{DS}^-]$ の捕集率を Fig. 6.2.2.5.-1 に示した。Fig. 6.2.4.1.-1 (b) は、Log R/(1-R) と Log $[\text{DS}^-]$ の関係である。勾配 1.06 (=n) は、1 つの DS^- 結合が 1 つの $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体に結合していることを示している。

上記の実験結果は、抽出された種が $(\text{Cr}-(\text{DPC})_3) \cdot \text{H}^+ \cdot \text{DS}^-$ であることを示した。その結果、 $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体は $[\text{H}^+]$ と 1 : 1、 $[\text{DS}^-]$ と 1 : 1 で結合し、XAD-7HP に分配していることが分かった。

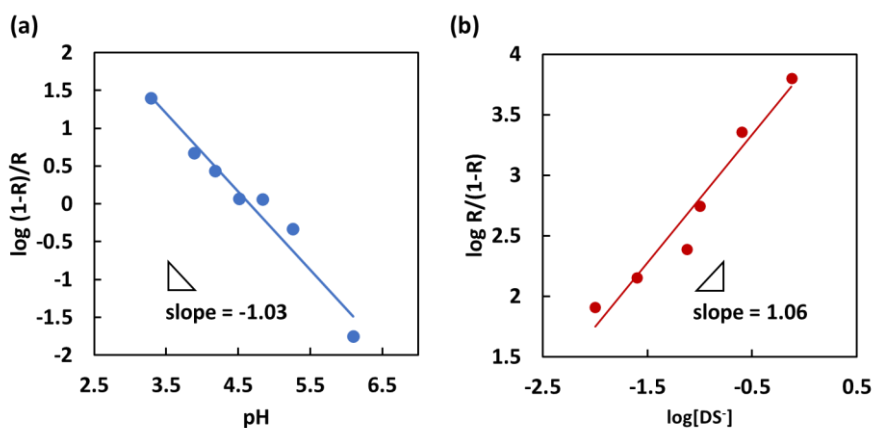


Fig. 6.2.4.1.-1 傾斜比法を用いた $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体の抽出時の化学量論の推定 (a) pH, (b) $[\text{DS}^-]$ (吸着条件; 試料量: 1 mL, 微粒子 (XAD-7HP) 5 mg)

6.3. まとめ

沈降性分散微粒子を使用したイオン対 SPE による微量 Cr(VI) の簡易画像比色分析を提案した。プロトン化された $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体を保持するための対イオンとして、ドデシル硫酸イオンが最適であった。イオン対を保持するための吸着微粒子として、親水性の中性樹脂、XAD-7HP を選択した。本法は、1つの容器で5分以内に呈色と微粒子への吸着が完了する。さらに、環境基準値である 0.02 mg/L の Cr(VI) を目視で測定できる十分な感度を持つ。比色画像解析で $\mu\text{g/L}$ レベルの Cr(VI) を検出できた。本法は模擬排水の測定に適用できたため、現場での微量な Cr(VI) のスクリーニングとオンサイト測定に役立つことが期待できる。また、イオン対-溶媒抽出と同じパラメーターを使用して最適化した条件下で、イオン対-固相抽出 (SPE) が $[\text{Cr}-(\text{DPC})_3]$ 錯体の捕集に有用であった。さらに、傾斜比法を用いて解析することで、XAD-7HP への抽出化学種は $\text{Cr}(\text{DPC})_3 \cdot \text{H}^+ \cdot \text{DS}^-$ であることがわかった。本法は、溶媒抽出の吸着理論で微粒子へのイオン対抽出の機構を説明できることから、各定数から微粒子への捕集条件を推定することに役立つことが可能である。

6.4. 参考文献

- [1] B. Dhal, H. N. Thatoi, N. N. Das, B. D. Pandey, *Hazard. Mater.*, (2013), 250-251, 272-291
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.048>
- [2] M.-H. Ho, C.-M. Chan, I. Bakar, *Int. J. Sustain. Constr. Eng.*, (2011), 1, 91-104
<https://publisher.uthm.edu.my/ojs/index.php/IJSCET/article/view/66>
- [3] M. Chrysochoou, S. C. Fakra, M.A. Marcus, H. M. Deok, D. Dermatas, *Environ. Sci. Technol.*, (2009), 43, 5461-5466. <https://doi.org/10.1021/ES9005338>
- [4] X. Liuyang, H. Yang, S. Huang, Y. Zhang, S. Xia, *J. Environ. Chem. Eng.*, (2020), 8, 104474.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104474>
- [5] M. A. Schneegurt, J. C. Jain, J. A. Menicucci, S. A. Brown, K. M. Kemner, D. F. Garofalo, M. R. Quallick, C. R. Neal, J. F. Kulpa, *Environ. Sci. Technol.*, (2001), 35, 3786-3791.
<https://doi.org/10.1021/es010766e>
- [6] C. Földi, R. Dohrmann, K. Matern, T. Mansfeldt, *J. Soils Sediments*, (2013), 13, 1170-1179.
<https://doi.org/10.1007/S11368-013-0714-2>
- [7] A. M. Zayed, N. Terry, *Plant Soil*, (2003), 249, 139-156. <https://doi.org/10.1023/A:1022504826342>
- [8] Chromium in drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality, 2020. <http://apps.who.int/bookorders> (Accessed October 7, 2021)
- [9] Chromium in Drinking Water | US EPA, <https://www.epa.gov/sdwa/chromium-drinking-water> (Accessed October 7, 2021)

- [10] Chromium in Water - Theory, <http://www.acornusers.org/education/HNC-Web/Theory.html#Top> (Accessed October 8, 2021)
- [11] N. Unceta, F. Séby, J. Malherbe, O.F.X. Donard, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2010), 397, 1097-1111. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3417-1>
- [12] S. Gumfawar, B. Godbole, A Review on Removal of Heavy Metal (Cr and Cd) Using Plant Seeds for Purification of Water, Engineering, (2017)
- [13] Diphenylcarbazine - an overview | ScienceDirect Topics, <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/diphenylcarbazine> (Accessed October 8, 2021)
- [14] SW-846 Test Method 7196A: Chromium, Hexavalent (Colorimetric) | US EPA, <https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-7196a-chromium-hexavalent-colorimetric> (Accessed August 30, 2022)
- [15] R. Soares, M.C. Carneiro, M.I.C. Monteiro, S. de S. Henriquae, F.V.M. Pontes, L.I. Dias da Silva, A.A. Neto, R.E. Santelli, *Chem. Speciat. Bioavail.*, (2009), 21, 153-160 <https://doi.org/10.3184/095422909X466095>
- [16] A. Sanchez-Hachair, A. Hofmann, *Comptes Rendus Chim.*, (2018), 21, 890-896. <https://doi.org/10.1016/J.CRCI.2018.05.002>
- [17] M. Gardner, S. Comber, *Analyst*, (2002), 127, 153-156. <https://doi.org/10.1039/B109374F>
- [18] K. K. Onchoke, S. A. Sasu, *Adv. Environ. Chem.*, (2016) <https://doi.org/10.1155/2016/3468635>
- [19] K. Shigeta, A. Fujita, T. Nakazato, H. Tao, *Anal. Sci.*, (2018), 34, 925-932. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.18P012>
- [20] Z. Li, Y. Shi, P. Gao, X. Gu, T. Zhou, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, (1997), 358, 519-522. <https://doi.org/10.1007/S002160050458>
- [21] S. Matsuoka, Y. Nakatsu, K. Takehara, S. Saputro, K. Yoshimura, *Anal. Sci.*, (2006), 22, 1519-1524. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.1519>
- [22] D. E. Kimbrough, Y. Cohen, A. M. Winer, L. Creelman, C. Mabuni, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, (2010), 29, 1064-3389. <https://doi.org/10.1080/10643389991259164>
- [23] F. J. Alguacil, A. G. Coedo, M. T. Dorado, A. M. Sastre, *Hydrometallurgy*, (2001), 61, 13-19. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(01\)00147-5](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(01)00147-5)
- [24] V. Camel. *Acta Part B At. Spectrosc*, (2003), 58, 1177-1233. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(03\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(03)00072-7)
- [25] I. M. M. Rahman, Z. A. Begum, H. Hasegawa, *Microchem. J.*, (2013), 110, 485-493. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2013.06.006>
- [26] B. Galán, D. Castañeda, I. Ortiz, *Water Res.*, (2005), 39, 4317-4324. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2005.08.015>
- [27] N. Rajesh, B.G. Mishra, P. K. Pareek, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, (2008), 69,

- 612-618. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.05.011>
- [28] N. Rajesh, R. K. Jalan, P. Hotwany, *J. Hazard. Mater.*, (2008), 150, 723-727. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.025>
- [29] R. Verma, S. Sarkar, *Ind. Eng. Chem. Res.*, (2020), 59, 21187-21195. <https://doi.org/10.1021/ACS.IECR.0C04347>
- [30] T. Kamidate, T. Segawa, H. Watanabe, K. Yamaguchi. *Anal. Sci.*, (1989), 5, 429-433. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.5.429>
- [31] T. Inui, K. Fujita, M. Kitano, T. Nakamura. *Anal. Sci.*, (2010), 26, 1093-1098. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.26.1093>
- [32] S. I. Hasegawa. *ISIJ Int.*, (2014), 54, 131-135. <https://doi.org/10.2355/ISIJINTERNATIONAL.54.131>
- [33] Sarenqiqige, M. Ashitomi, K. Yoshimura, *Anal. Sci.*, (2013), 29, 823-829. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.29.823>
- [34] Y. Yokota, A. Manaka, M. Tafu, T. Kato, K. Tomita, T. Akazawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, (2019), 92, 807-810. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20180351>
- [35] T. Kato, Y. Nagashima, A. Manaka, C. Nakamura, S. Oshite, S. Igarashi. *Anal. Sci.*, (2019), 35, 939-942. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.19N001>
- [36] A. Manaka, Y. Ueno, M. Tafu, T. Kato. *Anal. Sci.*, (2022), 38, 223-226. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.21N029>
- [37] K. Yoshimura, S. Ohashi, *Talanta*, (1978), 25, 103-107. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(78\)80041-1](https://doi.org/10.1016/0039-9140(78)80041-1)
- [38] S. Saputro, K. Yoshimura, S. Matsuoka, K. Takehara, Narsito, *Anal. Sci.*, (2009), 25, 1445-1450. <https://doi.org/10.2116/analsci.25.1445>
- [39] Sarenqiqige, S. Saputro, S. Kai, M. Satoda, S. Matsuoka, K. Yoshimura, *Anal. Sci.*, (2013), 29, 677-680. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.29.677>
- [40] T. Takahashi, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi. *Anal. Sci.*, (2006), 22, 1585-1588. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.1585>
- [41] Sarenqiqige, M. Ashitomi, K. Yoshimura, *Anal. Sci.*, (2013), 29, 823-829. <https://doi.org/10.2116/analsci.29.823>
- [42] H. Asano, Y. Shiraishi, *Anal. Sci.*, (2018), 34, 71-74 <https://doi.org/10.2116/analsci.34.71>
- [43] H. M. Zhai, T. Zhou, F. Fang, Z.Y. Wu, *Talanta*, (2020), 210, 120635. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120635>
- [44] A. Muhammed, A. Hussien, M. Redi, T. Kaneta, *Anal. Sci.*, (2021), 37, 585-592. <https://doi.org/10.2116/analsci.20P325>
- [45] W. Tan, Aruna, Z. Xu, L. Zhang, W. Shen, *Talanta*, (2020), 218, 121116. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121116>
- [46] W. Alahmad, P. Varanusupakul, T. Kaneta, P. Varanusupakul, *Anal. Chim. Acta.*, (2019), 1085, 98-

106. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2019.08.002>
- [47] W. Alahmad, N. Tungkijanansin, T. Kaneta, P. Varanusupakul, *Talanta*, (2018), 190, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.056>
- [48] N. Kohama, Koki Matsuhira, Takuya Okazaki, K. Sazawa, N. Hata, Hideki Kuramitz, S. Taguchi, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2022), 414, 8389-8400. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04375-y>
- [49] D. K. Sharma, R. Sharma, *Indian J. Sci. Technol.*, (2015), 8, 1-6. <https://doi.org/10.17485/IJST/2015/V8I11/71773>
- [50] L. Liu, Y. Leng, H. Lin, *Microchim. Acta.*, (2016), 183, 1367-1373. <https://doi.org/10.1007/S00604-016-1777-8>
- [51] 渡部 貴裕, 水口 仁志, 志田 惇一, *分析化学*, (2011), 60, 339-344. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.60.339>
- [52] 田口 茂, 中村 和憲, 平出 武, 後藤 克己, *分析化学*, (1982), 31, 548-549. https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.31.9_548
- [53] 笠原 一世, 大垣 順久, 松井 薫子, 加納 和仁, 田口 茂, 後藤 克己, *日本化学会誌 (化学と工業化学)*, (1986), 1986, 894-900. <https://doi.org/10.1246/nikkashi.1986.894>
- [54] K. Miyabe, S. Taguchi, I. Kasahara, K. Goto, *J. Phys. Chem. B.*, (2000), 104, 8481-8490. <https://doi.org/10.1021/jp000918c>

第7章 過マンガン酸イオンの吸着を利用した簡易分析法の開発

—Mn と化学的酸素要求量 (COD) の測定—

7.1. はじめに

本研究では、生成した過マンガン酸イオン (MnO_4^-) を静電吸着で 4 級アンモニウム塩を修飾したシリカゲル基盤のイオン交換体 (Wakogel[®] 50SAX : $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$) に捕集した。 Mn^{2+} は、過ヨウ素酸塩と反応し MnO_4^- (ピンク) を生成する [1, 2]。ここで生成した MnO_4^- を $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ に捕集し色調の増加量から Mn^{2+} を定量した。一方で、化学的酸素要求量 (COD) はアルカリ性 ($> \text{pH } 11$) で過マンガン酸カリウムを酸化させ、溶液を中性 ($\text{pH } 6\sim 7$) にして MnO_4^- を $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ に捕集する。そのため、色調の減少量で測定する。本法は、同じ吸着原理を用いて 2 種類の簡易分析法を同研究室の川畑美佳 (修士論文(2021)) と共同で開発したものであり、原理の考案やデータの解析を筆者が担当した。

7.2. Mn の簡易分析法の開発

7.2.1. 本研究の捕集形態について

本研究では、 Mn^{2+} を過ヨウ素酸塩と反応させて、 MnO_4^- を生成した。 MnO_4^- は負電荷を持つため、静電吸着を利用して $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ に捕集した。ここでは Mn^{2+} 濃度に応じて増加する色調から Mn^{2+} を測定した。

7.2.2. Mn^{2+} について

マンガン(Mn)は岩石、土壌、および水中など、幅広く存在する。粒子状マンガンとして環境中を移動するだけでなく、 pH と酸化還元電位によって形態を変える [3]。Mn の産業分野での利用は Mn 乾電池やアルカリ乾電池の正極や、肥料、染料工業などが挙げられ、私たちの生活に欠かせない金属である [4]。水圏では Mn(II)と Mn(IV)の形態で存在し [5]、地下水中に存在していることが多く、主な流入源は鉱山廃水や工場排水などである [6, 7]。また、環境中の水域では、底層水の溶存酸素が少なくなると底質から溶出してくる場合もある。水道水中に 0.1 mg/L を超える濃度を含む場合、食器や洗濯物を汚したり金属味をもたらしたりするだけでなく排水システムに悪影響を与える。厚生労働省は水道水基準値を 0.05 mg/L と定めている。Mn が 0.02 mg/L 程度含有することで水道水中に黒色沈殿物が生成し黒色障害を生じることが知られている [8]。

Mn²⁺の主な分析方法[9]としては、過マンガン酸吸光光度法や過硫酸アンモニウム酸化法、原子吸光法などがある。

7.2.3. 分析法の開発

7.2.3.1. 実験

7.2.3.1.1. 装置と試薬

紫外可視分光光度計（島津製作所，UV-1800），ガラス電極式水素イオン濃度指示計（HORIBA，D-51），撮影ボックス HAD QT-310（G・T・B・T），pH/Ion 卓上型メーター（METTER TOLEDO，Seven Compact S220-ベーシック），ポータブル水質分析計（HACH，DR/850 Colorimeter），電気伝導率計（東亜 DKK，CM-31P），カメラとして，デジタルカメラ：DS 126441（Canon），スマートフォンカメラ：iPhone 8，Xperia SO-05K を使用した。測定した画像は，Adobe Photoshop CC 2019，フリーソフト ImageJ を用いて解析した。過ヨウ素酸カリウム，過ヨウ素酸ナトリウム，クエン酸三ナトリウム，リン酸二水素ナトリウム，リン酸二水素カリウム，リン酸水素二ナトリウム，塩化ナトリウム，塩化アンモニウム，塩化カリウム（FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）。Zephiramine[®]（Tokyo Chemical Industry Co, Ltd.）。フミン酸 Suwannee River II，フルボ酸 Suwannee River II（Sigma-Aldrich Co. LLC）。試薬は，特級を使用し，全て超純水を用いて調製した。吸着剤として，Wakogel[®] 50-SAX（トリメチルアミノプロピル修飾シリカゲル：(SiO₂)-R₃NH₃⁺）（形状：全多孔性破碎型，粒径：40～63 μm），Wakogel[®] 50-DEA（ジエチルアミノプロピル修飾シリカゲル：(SiO₂)-R₂NH₃）（形状：全多孔性破碎型，粒径：40～63 μm），Wakogel[®] C-300（形状：全多孔性破碎型，粒径：45～75 μm）（FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）を使用した。各吸着剤は，水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。

7.2.3.1.2. 確立した測定方法

Mn²⁺の確定した簡易分析操作を示した。

1.5 mL マイクロチューブに、1 mg リン酸塩 pH 緩衝剤、4 mg 過ヨウ素酸ナトリウム、5 mg クエン酸三ナトリウム、(SiO₂)-R₃NH₃⁺ 30 mg を加える。このチューブに、適宜濃度調整した Mn²⁺溶液 1 mL を添加し、約 30 秒間軽く攪拌する。微粒子が液相と分離・沈積した後に、撮影ボックスに設置し、一眼レフを用いて撮影する。撮影した写真はパソコンに取り込み、Adobe Photoshop で Gray 値を調べる。

7.2.4. 結果と考察

7.2.4.1. 吸着剤微粒子の選択

本法は、MnO₄⁻とシリカゲルの表面電荷との相互作用（静電吸着）を利用している。本法に最適な微粒子を選択するため、(SiO₂)-R₃NH₃⁺、(SiO₂)-R₂NH₃、SiO₂ に陽イオン界面活性剤をコーティングした(SiO₂)-Zeph⁺の 3 種類で 1 mg/L 過マンガン酸カリウム溶液 1 mL を各微粒子 30 mg に吸着させ捕集率を比較した (Fig. 7.2.4.1.-1)。結果、(SiO₂)-R₂NH₃ は酸性条件でプラスに帯電するため、中性条件での吸着には不適であった。(SiO₂)-Zeph⁺ は MnO₄⁻は吸着しなかった。最も捕集能が高かった(SiO₂)-R₃NH₃⁺を微粒子として選択した。

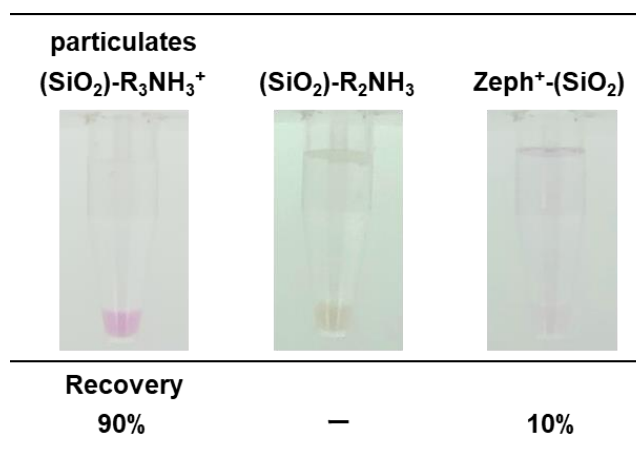


Fig. 7.2.4.1.-1 微粒子の種類と MnO₄⁻の捕集量

7.2.4.2. 微粒子の添加量の検討

微粒子の添加量を増やすことで高い捕集率が得られる一方で、一定量以上加えると微粒子自身の白色による色調の薄まりが感度に影響を及ぼす。0～50 mg で 10 mg ずつ添加量を変え、KMnO₄ (0, 0.1, 0.5, 1 mg/L) を吸着させた (Fig. 7.2.4.2-1 (a))。沈積した微粒子の Gray 値を調べたところ KMnO₄ 濃度が高くなるにつれて Gray 値も高くなり、微粒子の添加量によって感度が変わった (Fig. 7.2.4.2-1 (b))。微粒子の添加量が 30 mg 以降は感度が低下したため 20 mg が最適であった。

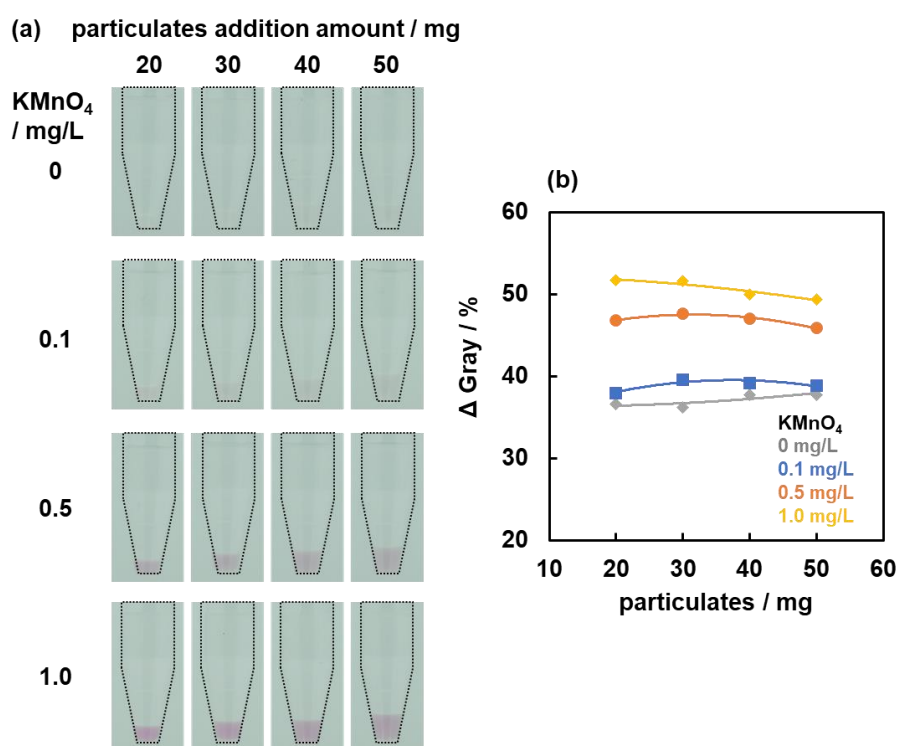


Fig. 7.2.4.2-1 微粒子の添加量ごとの様子

(a) 添加量ごとの微粒子の写真, (b) 添加量ごとの微粒子の色調変化 (Gray 値)

7.2.4.3. 呈色試薬の検討とイオン強度の影響

本法は静電吸着で(SiO₂)-R₃NH₃⁺に MnO₄⁻を捕集する。そのため、吸着は共存イオン(陰イオン)の影響を受ける。そこで最適な添加する試薬濃度を検討した。Mn²⁺ 2.0 mg/L, (SiO₂)-R₃NH₃⁺ 20 mg を添加し、呈色試薬の相対的なイオン強度 (*I*) と捕集率の関係と NaCl 濃度ごとの MnO₄⁻を(SiO₂)-R₃NH₃⁺に吸着した時の微粒子の色調を測定した (Fig. 7.2.4.3.-1)。その結果、*I* ≤ 0.05 で 70%以上の捕集率が得られた (Fig. 7.2.4.3.-1 (a))。そのため、秤量可能な量として、リン酸緩衝剤は 1 mg, 過ヨウ素酸ナトリウムは 4 mg, クエン酸三ナトリウムは 5 mg を最適な試薬量とした (溶液 1 mL 中 *I* = 0.027)。また、*I*が高くなるに従って、沈積した微粒子の Green 値が変化し色が薄くなることで感度が悪くなった (Fig. 7.2.4.3.-1 (b))。環境水中の *I*は、河川水 *I*=0.1, 海水(沖合) *I*=0.7 であることから、河川水や汽水では *I*による妨害は小さいと考えられる。

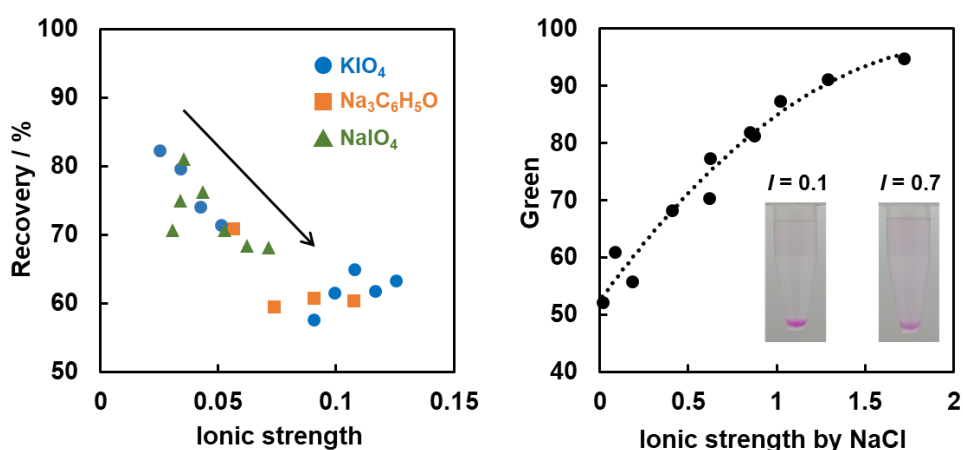


Fig. 7.2.4.3.-1 イオン強度 (*I*) による捕集率と感度の影響

(a) 反応試薬ごとの捕集率の変化, (b)イオン強度 (NaCl) ごとの微粒子の色調変化

7.2.4.4. 測定時間と呈色の安定性

時間ごとの微粒子の呈色強度 (Mn²⁺, 1 mg/L) を測定し測定時間を調べた (Fig. 7.2.4.4.-1)。結果、試料水を添加し 30 秒で呈色強度は安定した。そのため本法は採水後 1 分以内に測定可能である。また、MnO₄⁻は時間に応じて退色することが知られているが本法は 10 分以降も微粒子に吸着した色は安定していた。

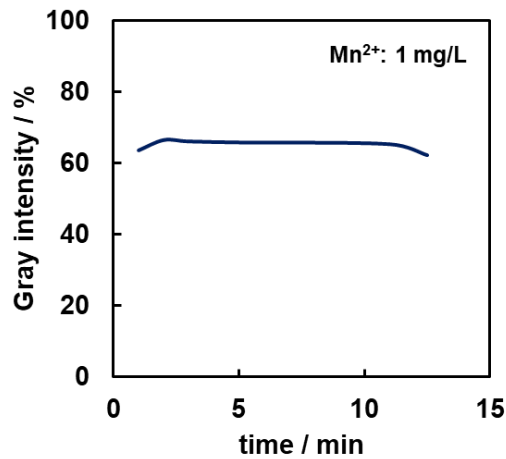


Fig. 7.2.4.4.-1 MnO_4^- 吸着後の微粒子の Gray 値の経時変化

7.2.4.5. 定量範囲

Fig. 7.2.4.5.-1 (a)に 0~0.1 mg/L Mn^{2+} のマイクロチューブの写真を示した。微粒子を添加することで Mn^{2+} の濃度変化をはっきりと目視確認することができ、0.1 mg/L から目視で判定できた。沈積した微粒子（固相）の色調の強度を Photoshop のソフトウェアで Gray 値を測定したところ、0.1~1.0 mg/L で $y = 16.01x + 0.45$, $R^2 = 0.99$ ($n=3$) の検量線が得られた (Fig. 7.2.4.5.-1 (b))。検出限界は 0.05 mg/L ($3\sigma_B$) であった。本法は微粒子を加えることで溶液の画像解析の結果と比較して約 10 倍の高感度化を達成した。また、本法は水道水基準値 (Mn^{2+} 濃度 0.05 mg/L) を測定することができる。

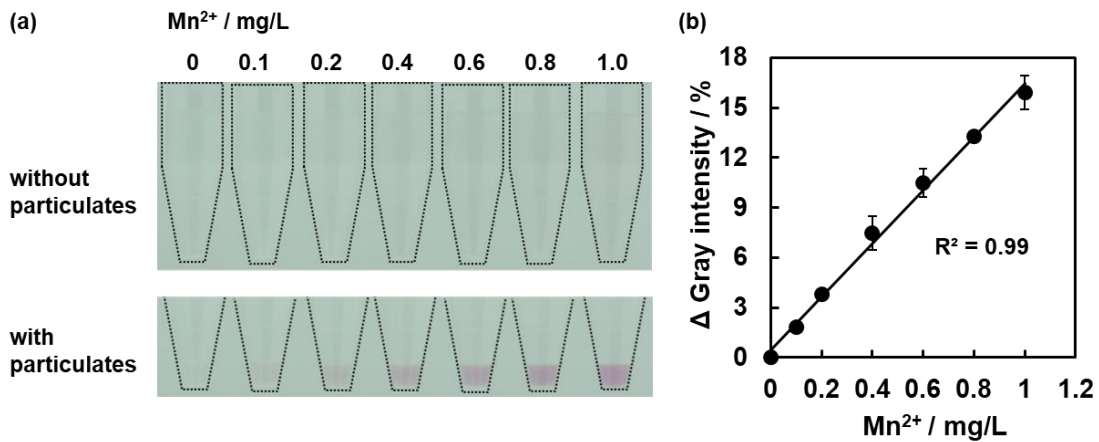


Fig. 7.2.4.5.-1 Mn^{2+} 濃度ごとの写真と画像解析で得られた検量線

(a) Mn^{2+} 濃度ごとの写真, (b) 画像解析 (Gray 値) の検量線

7.2.4.6. 試料水中の着色成分の影響

使用した微粒子は陰イオン交換体であるため、環境水中の負電荷をもつ成分の影響を受ける。そこで、地下水中でも存在する腐植物質（フミン酸，フルボ酸）で影響を調べた（Fig. 7.2.4.6.-1）。結果，フミン酸が 40 mg/L と高濃度である場合， MnO_4^- の吸着と測定感度に影響したが，フルボ酸からの影響は小さかった。従って，一般的な湖沼や河川水では影響なく測定できると考えられる。

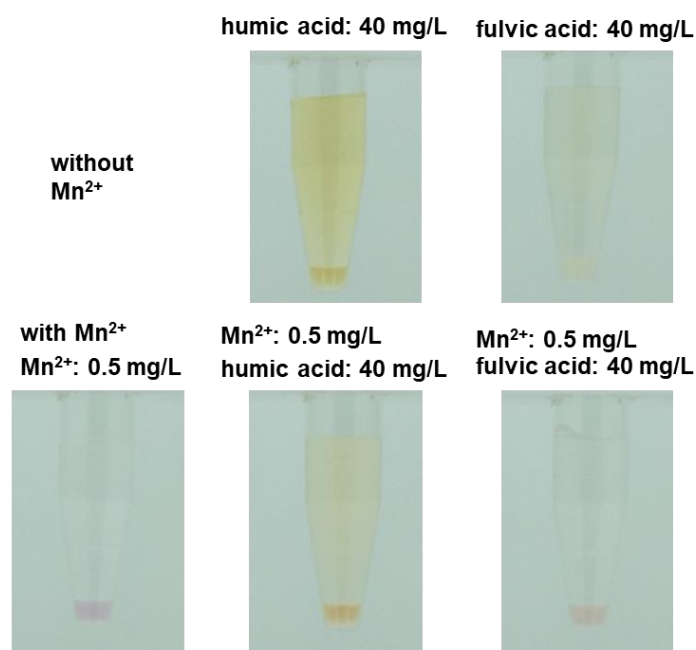


Fig. 7.2.4.6.-1 フミン酸とフルボ酸の測定への影響

7.2.5. 環境水の測定

本法を用いて，富山大学理学部の地下水を用い，吸光光度法の結果と，試料に酸を加えて前処理して測定した原子吸光度法の結果を本法と比較した。測定結果を Table. 7.2.5.-1 に示す。本法は吸光光度法とよく一致した。また，標準添加法で測定したところ低濃度では，吸光光度法と同様な結果が得られた（Fig. 7.2.5.-1）。本法は地下水中の Mn^{2+} 測定できた。

Table. 7.2.5.-1 地下水の測定結果

measuring method	detected value / mg/L
this method	0.38
absorptiometry	0.38
AAS	0.40

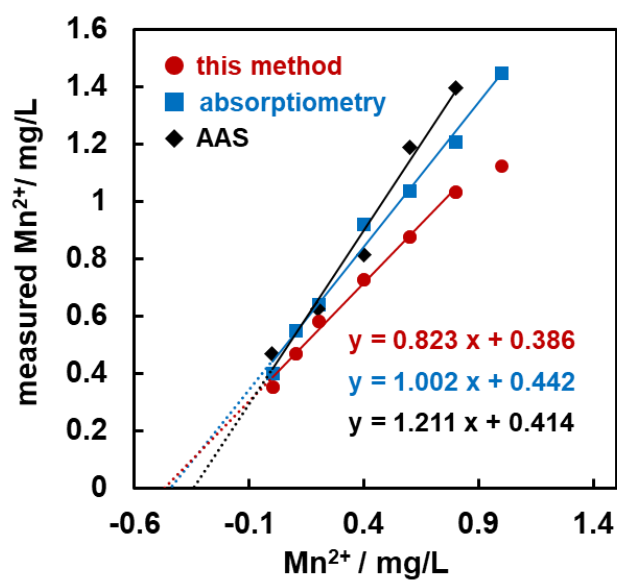


Fig. 7.2.5.-1 各測定方法での標準添加法の比較

(●, 赤線: 本法 (画像測色法), ■, 青線: 吸光光度法, ◆, 黒線: 原子吸光光度法)

7.3. 化学的酸素要求量(COD)の簡易分析法の開発

KMnO_4 と有機物が反応して生成した MnO_4^- の $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ への捕集では、pH条件が大きなポイントとなる。 MnO_4^- の $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ への吸着はpHが中性の場合、安定であったが、pHがアルカリ性の場合、 $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ が有機物として反応し不安定で測定できなかった。CODの測色法を確立するにあたって、シャルローが提唱したマンガンの酸化還元電位系の近似的な見かけの電位とpHとの関係を理解する必要がある[5, 10]。マンガンは2~7価の価数を取り、色変わりはマンガンの形態に起因する。強アルカリ条件では過マンガン酸イオン、マンガン酸イオン、二酸化マンガンの三成分が酸化還元電位に応じて存在する。しかし、中性では過マンガン酸イオンと二酸化マンガンの二成分が存在する。このマンガンの形態変化をヒントに測色法の構築を試みた。

7.3.1. 本研究の捕集形態について

本法では、 MnO_4^- （赤紫色）が微粒子（ $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ ）に吸着する原理を利用して、常温アルカリ性過マンガン酸カリウム酸化法を利用する化学的酸素要求量(COD)の測色法への応用を試みた。予め添加する過マンガン酸カリウムと有機物（D-グルコース）を反応させ、残留した MnO_4^- を測定する。

7.3.2. CODについて

環境水中には炭水化物、蛋白質、油脂類、有機酸あるいは難分解性有機物などの有機物が存在している。人工由来の有機物が環境中に多量に排出されると、自然の自浄作用が追いつかず、水質汚濁を引き起こすことがしばしばある[11]。そのため、海域やその他水環境では、有機物の日常的なモニタリングが非常に大切である。

有機物指標のひとつに化学的酸素要求量（COD）がある。水中の物質が酸化剤で酸化や分解されるときに消費される酸素量のことであり、水質汚濁の指標となる。CODの基準値として利用目的に応じた分類（水域類型）でCOD基準値が定められている（Table. 7.3.2.-1）[12-14]。CODの基準値は流れが比較的なく、有機物の滞留時間が長くなる湖沼や閉鎖的海域で指定類型ごとに定められている。湖沼では、プランクトンの増殖による有機汚濁があり、COD 1.0 mgO/L以下は自然由来と考えられる。水産用水においては、水産生物の好む環境によって基準が変わり、一般的な富栄養湖では、コイやフナは5 mgO/L以下が適当であると考えられている。海域のCODでは、一部アルカリ法が採用されている。

COD 測定法には様々な方法があり、用いる酸化剤と被酸化剤物質の種類で異なる。海外では二クロム酸カリウム法 (COD_{Cr}) が標準方法として用いられ、日本では酸性過マンガン酸カリウム法 (COD_{Mn}) が標準方法に用いられている。COD_{Mn} の酸化力は COD_{Cr} と比較して低い一方で、有害な重金属を使用しない。COD_{Mn} の分解特性についてフェノール類、フェノール類似部位を有する分子は短時間で分解されやすい。異なる酸化剤や pH、加熱時間、測定方法 (COD_{Mn}, COD_{Cr}, TOC) で有機物の酸化率がそれぞれ異なるため、複雑な組成をもつ環境水では相関をとれないこともある [15, 16]。

JIS K 010244 に定める COD_{Mn} に対して操作の短縮化や測定値を補正する方法の報告がされている [17-20]。近年では、迅速かつ高感度で環境に優しい方法として簡易分析法が注目されている。既存の COD 簡易測定キットは常温アルカリ性過マンガン酸カリウム酸化法の原理を用いており、色調変化に合わせた濃度の読み取りを行っている。

Table. 7.3.2.-1 COD の湖沼, 海域, 水浴場での基準値

類型	利用目的の適応性	COD	
湖沼	水道 1 級 水質 AA 水産 1 級 自然環境保全及び A 以下の欄に掲げるもの	1 mg/L 以下	
	水道 2, 3 級 水質 A 水産 2 級 水浴及び B 以下の欄に掲げるもの	3 mg/L 以下	
	水産 3 級 水質 B 工業用水 1 級 農業用水及び C の欄に掲げるもの	5 mg/L 以下	
	工業用水 2 級 水質 C 環境保全	8 mg/L 以下	
	海域	A 水産 1 級 水浴, 自然環境保全及び B 以下の欄に掲げるもの	2 mg/L 以下
		B 水産 2 級 工業用水及び C の欄に掲げるもの	3 mg/L 以下
C 環境保全		8 mg/L 以下	
区分		COD	
水浴場	水質 AA	2 mg/L 以下	
	適	(湖沼は 3 mg/L 以下)	
	水質 A	2 mg/L 以下	
	(湖沼は 3 mg/L 以下)		
	水質 B	5 mg/L 以下	
可			
水質 C	8 mg/L 以下		
不適	8 mg/L 超		

7.3.3. 分析法の開発

7.3.3.1. 実験

7.3.3.1.1. 装置と試薬

7.2.3.1.1. 装置と試薬に実験に用いた装置及び画像解析ソフトを記載した。過マンガン酸カリウム、水酸化リチウム、炭酸ナトリウム、水酸化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、アミド硫酸、D-グルコース、塩化ナトリウム、ホウ酸、臭化カリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム二水和物、硫酸ナトリウム、塩化マグネシウム六水和物、ケイ酸ナトリウム九水和物、炭酸水素ナトリウム、塩酸、シュウ酸ナトリウム、硝酸銀 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。試薬は、特級を使用し、全て超純水を用いて調製した。吸着剤として、Wakogel® 50-SAX (トリメチルアミノプロピル修飾シリカゲル： $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$) (形状：全多孔性破碎型，粒径：40～63 μm) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。各吸着剤は、水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。

7.3.3.1.2. 確立した測定方法

(1) 淡水への応用

淡水中の COD の確定した分析操作を以下に示す (Fig. 7.3.3.1.2.-1)。1.5 mL マイクロチューブに、水酸化リチウム：硫酸ナトリウム (2：8) 混合粉末 10 mg, 5 mM KMnO_4 溶液 0.0063 mL を添加し、試料を 1 mL 加え 3 分間反応させた。そこへリン酸二水素ナトリウム 5 mg を加え、振り混ぜる。 $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ 10 mg を添加し、軽く振り混ぜて静置し、沈積した微粒子の色調から COD を測定した。沈積した微粒子をスマートフォンで撮影し Photoshop で RGB 値と Gray 値を測定した。

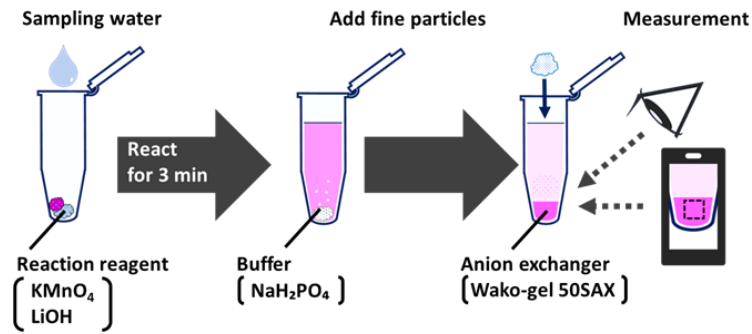


Fig. 7.3.3.1.2.-1 淡水の COD 測定法の概略

(2) 海水・淡水への応用

海水（淡水・汽水）中の COD の確定した分析操作を以下に示す（Fig. 7.3.3.1.2.-2）。

1.5 mL マイクロチューブに 7.5 mg の水酸化リチウム 5 mM KMnO_4 溶液 0.0082 mL を添加し，試料 1 mL を加え 3 分間反応させた。水酸化物の沈殿を遠心分離（2000 rpm，60 秒）で除去した。その後，上澄み溶液を 0.5 mL 分取し，pH 調整剤（アミド硫酸：リン酸水素二ナトリウム＋リン酸二水素ナトリウム＝4：13）20 mg を加え振り混ぜた。（ SiO_2 ）- R_3NH_3^+ 40 mg を添加し，軽く振り混ぜて静置し，沈積した微粒子の色調から COD を測定した。沈積した微粒子をスマートフォンで撮影し Adobe Photoshop で RGB 値と Gray 値を測定した。

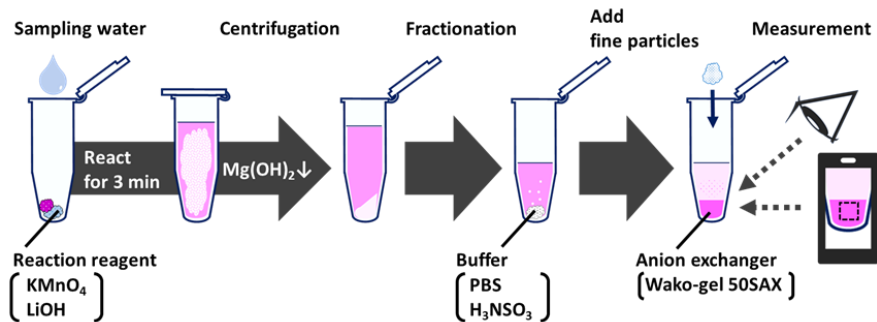


Fig. 7.3.3.1.2.-2 淡水・汽水・海水に応用可能な COD 測定法の操作の概略

7.3.4. 結果と考察

7.3.4.1. 反応時の pH と MnO_4^- の吸着条件

0.03 mM KMnO_4 溶液 1 mL を水酸化リチウムで pH を調整し、グルコース溶液 (COD 50 mgO/L) で反応させ、吸光度 (MnO_4^- : 525 nm, MnO_4^{2-} : 606 nm) を測定した (Fig. 7.3.4.1.-1)。pH の上昇とともに MnO_4^- : 525 nm の減少と MnO_4^{2-} : 606 nm の生成が速やかに完了した。有機物との反応時の最適な pH は反応性を考慮して、水酸化リチウムの添加量を 2 mg/mL (0.048 M), pH 12.06 とした。しかし、pH 12.06 で、 MnO_4^- を $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ に吸着させたところ $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ が有機物として反応し測定できなかった (Fig. 7.3.4.1.-2 (a))。そこで、安定して吸着できる pH を検討した。pH を適宜変えて、0.03 mM KMnO_4 溶液 1 mL を $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ 10 mg に吸着したところ pH 7 付近の微粒子の色調 (Green 値) が安定であった (Fig. 7.3.4.1.-2 (b))。これは、 KMnO_4 と有機物の反応は pH がアルカリ性では促進されるが pH が中性では緩やかに反応するためである。そこで吸着時の最適な pH を 7.0 とした。

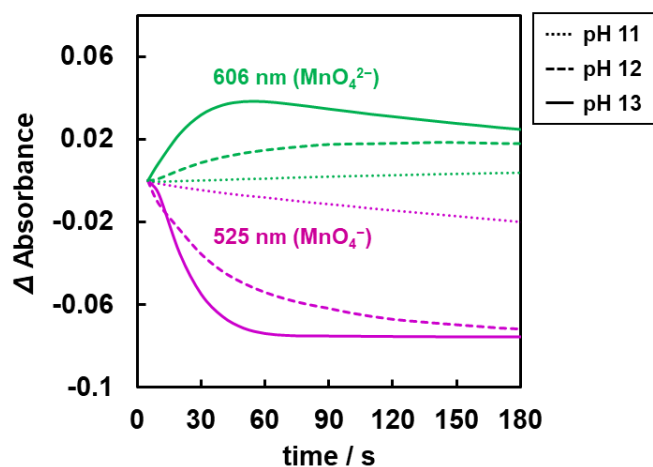


Fig. 7.3.4.1.-1 pH を変えた時の吸光度の経時変化

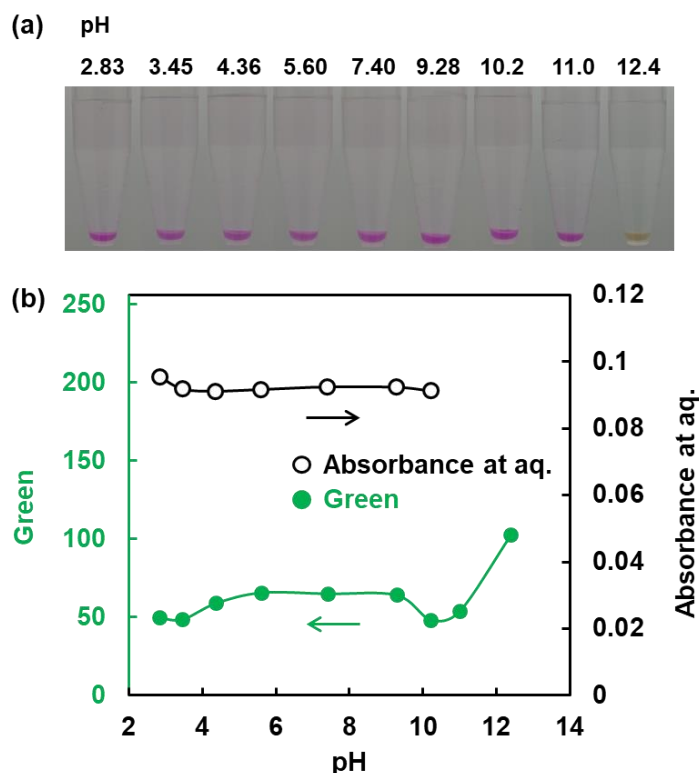


Fig. 7.3.4.1.-2 pH ごとの MnO_4^- 吸着時の微粒子の様子と色調

(a) pH ごとの MnO_4^- 吸着時の微粒子の写真, (b) pH ごとの水相の吸光度 (525 nm) と沈積した微粒子の色調 (Green 値) の様子

7.3.4.2. 反応時の温度の影響

酸化還元反応は温度の影響を受けやすい。そこで、環境水の水温変動 (0~30 °C) [21] に合わせて水温を変えて測定値への影響をみた。0.048 mM KMnO_4 溶液 (pH 12.06) にグルコース (COD 0, 25, 50, 100 mgO/L) を添加し, 3 分間反応後, リン酸二水素ナトリウムを 5 mg (0.04 mM : pH 7) 添加し水相の吸光度を測定した (Fig. 7.3.4.2.-1 (a))。同じ条件で, $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ 20 mg を添加し吸着した (Fig. 7.3.4.2.-1 (b))。その結果, 温度に応じて感度に変化し, COD 100 mgO/L の微粒子の色調も温度に応じて変化した。水温による反応性の違いを改善するために, 反応時間を変えて測定したところ, 水温 20 °C, 反応時間 3 分を基準とし, 10 °C 4 分 (+1 分), 30 °C 2 分 (-1 分) とすることで水温による影響を低減できた。

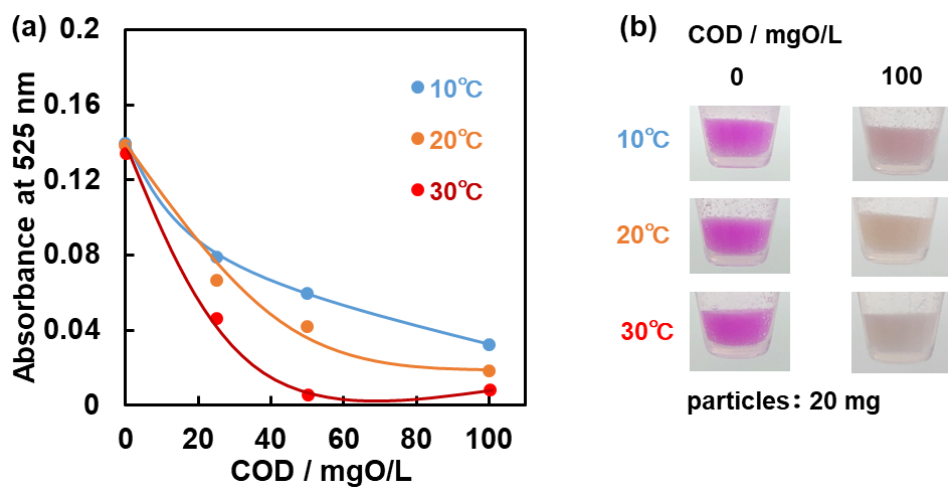


Fig. 7.3.4.2.-1 測定感度への水温の影響

(a) 水温ごとの水相の吸光度 (525 nm) の変化, (b) 水温ごとの MnO_4^- 吸着時の微粒子の写真 (測定条件; 水温: 10, 20, 30 °C, 反応時間: 3 分間, 吸光度測定時, 吸着時は水相を pH 7.0 とした。)

7.3.4.3. 淡水の定量範囲

Fig. 7.3.4.3.-1 に, COD (D-グルコース) 0~100 mgO/L の反応時の様子を示す。溶液の色調 (Fig. 7.3.4.3.-1 (a), (b)) と比較して微粒子 (Fig. 7.3.4.3.-1 (c)) を添加することでよりはっきりと色調を判定することができた。沈積した微粒子の色調を Photoshop ソフトウェアで Red, Green, Blue, Gray 値を測定し検量線 ($n=5$) を作成した (Fig. 7.3.4.3.-1 (d))。各変動係数は Red 値, Blue 値が 1~2%, Gray 値が 3~5%, Green 値が 4~12% であった。変動係数が最大の Green 値を選択したところ, COD 0~20 mgO/L の範囲で $y = 1.30x + 57.01$, $R^2 = 0.99$ であった。

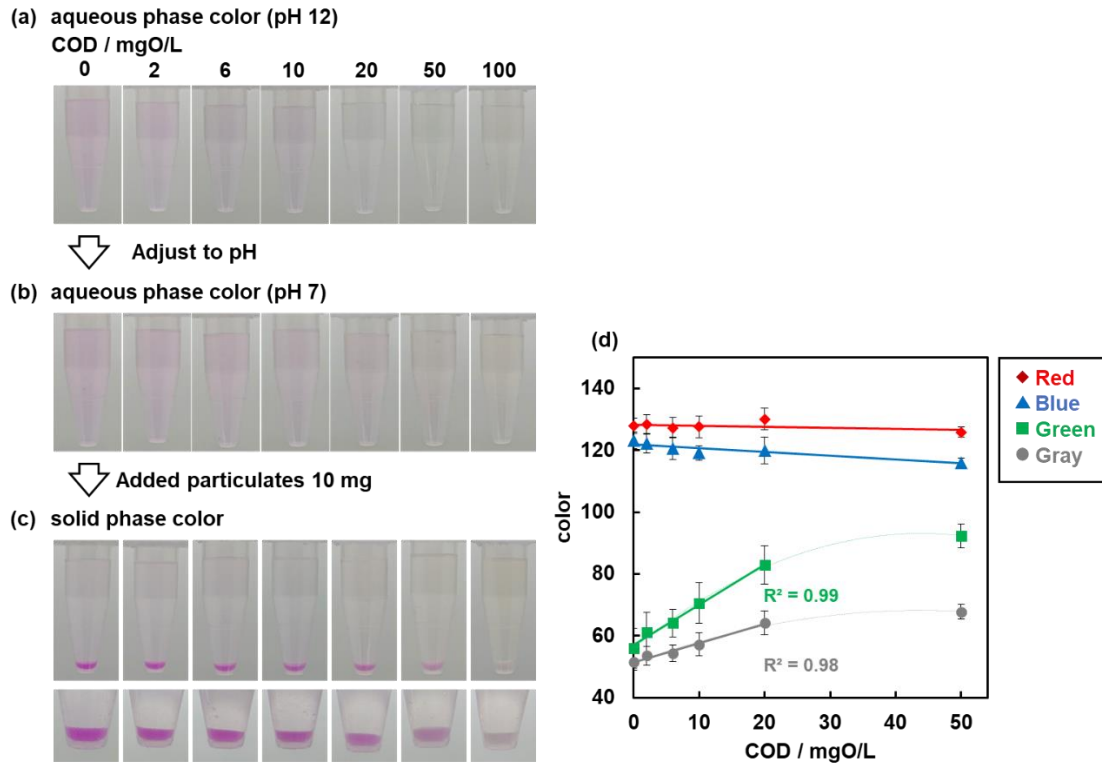


Fig. 7.3.4.3.-1 COD ごとに写真と画像解析で得られた検量線

(a) アルカリ性 (pH 12) の水相の様子, (b) 中性 (pH 7) の水相の様子, (c) 微粒子添加時の様子, (d) (c)の写真から沈積した微粒子を画像解析した結果 (◆ : Red, ■ : Green, ▲ : Blue, ● : Gray)

7.3.4.4. 淡水の実試料への応用

富山県内の河川と農業用水へ本法を応用した。採水した試料の測定結果を Table. 7.3.4.4.-1 に示した。環境水の一般的な電気伝導度[22]は、河川水で 0.03~0.4 mS/cm, 汽水湖で 1~10 mS/cm, 海水で 2~50 μ S/cm 程度であることから、採水した試料の新湊は海水, 小矢部川の 3 地点は汽水, その他の試料は淡水であると推測できる。

採水現場ではパックテスト®, 実験室では公定法 (COD_{Mn}) で試料水を測定し, 本法と比較した (Table. 7.3.4.4.-2)。また, 試料をメンブランフィルター ($\phi = 0.45 \mu\text{m}$) でろ過後, TOC 計で全溶存炭素を測定した。電気伝導度が高い試料 (EC > 1 mS/cm) の場合, 白色沈殿が生じたため測定できなかった。また, TOC と COD 値の相関は確認できなかった。本法と公定法を比較したところ, 電気伝導度の高い試料は電気伝導度の低い試料と比べて COD 値が高く算出された (Fig. 7.3.4.4.-1)。これは, 試料中の夾雑物 (塩類) が微粒子への MnO₄⁻の吸着を妨害するためである。公定法は酸性・高温条件下での測定, 本法は

アルカリ性・常温条件での測定であるため有機物との酸化反応や分解率を考慮する必要はあるが、電気伝導度の低い試料（EC = 0.03~0.4 mS/cm, 赤色プロット）と公定法（COD_{Mn}）の結果で相関が得られた。また、採水した流域ごとに傾向がわずかに見られた。本法は、KMnO₄の有機物ごとの反応性から水域ごとのCODの違いを簡易的に判定できるのではないかと考えられる。

Table. 7.3.4.4.-1 採水した試料の水質結果

sampling point	temperature / °C	water temperature / °C	pH	EC / mS/cm	ORP / mV	
20.9.23	万尾川	26.8	22.1	8.2	0.19	-
		25.8	22.2	7.9	0.36	-
	仏生寺川	24	20	7.6	0.17	-
		26	21.2	7.9	0.21	-
20.10.8	新湊港	25	23	6.7	42	-83
		25	22	7.9	43	-86
	小矢部川	25	20	8.5	3.2	-86
		25	20	8.2	0.16	-84
20.10.28	小矢部川	25	16.4	6.7	0.99	-87
		25	15.6	6.7	0.74	-84
	祖父川	25	15.4	7.2	0.019	-84
		25	15.9	6.7	0.015	-82
	松川	25	12	6.1	0.011	-90
		25	15.5	7.0	0.024	-90

Table. 7.3.4.4.-2 測定法ごとの COD 値の結果

sampling point	COD _{Mn} (n=3)	absorptiometry (n=3)	this method (n=3)	pack test®		TOC	
				visually	digital		
20.9.23	万尾川	5.17 ± 0.31	3.20 ± 0.79	5.0 ± 1.4	5.0	6.5	1.56
		5.34 ± 0.75	0.24 ± 0.53	5.3 ± 0.9	5.0	15.5	2.53
	仏生寺川	2.62 ± 0.41	1.98 ± 0.95	3.0 ± 2.0	1.0	14.0	3.58
		4.32 ± 0.24	2.23 ± 0.59	3.3 ± 0.7	1.0	3.5	3.77
20.10.7	新湊	3.78 ± 0.37	-	12.2	0.0	2.0	3.06
		2.55 ± 0.27	-	12.2	0.0	2.0	2.37
	小矢部川	3.95 ± 0.39	4.29 ± 0.55	7.5	5.0	4.0	3.15
		5.34 ± 0.29	0.28 ± 0.21	-	5.0	3.0	1.80
20.10.28	小矢部川	2.61 ± 0.15	0.79 ± 0.76	6.0 ± 1.1	5.0	5.0	-
		1.54 ± 0.23	6.67 ± 0.71	8.3 ± 0.6	5.0	5.0	-
	祖父川	1.58 ± 0.20	3.88 ± 0.52	6.0 ± 1.6	13.0	14.0	-
		0.10 ± 0.20	2.45 ± 0.26	3.9 ± 1.9	10.0	11.0	-
	松川	0.00 ± 1.36	3.42 ± 0.63	4.0 ± 1.4	0.0	2.0	-
0.89 ± 0.30		2.51 ± 0.18	3.2 ± 2.3	0.0	2.0	-	

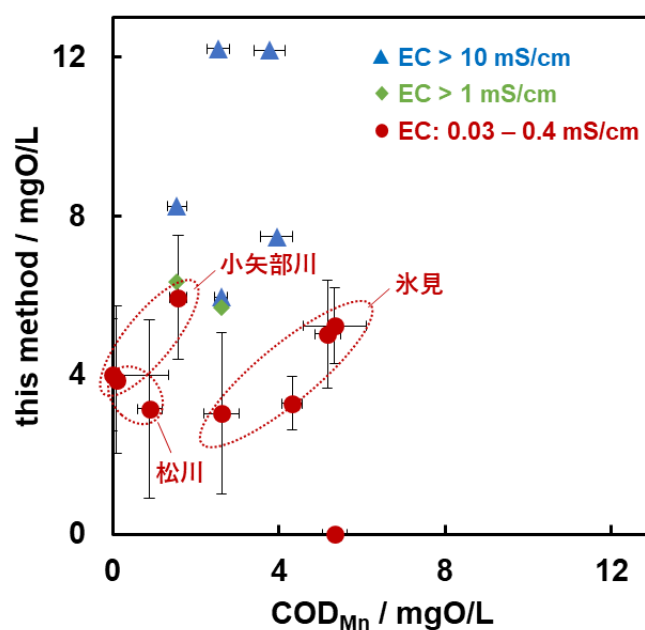


Fig. 7.3.4.4.-1 公定法 (COD_{Mn}) と本法の COD 値の関係

7.3.4.5. 海水への応用の為の改良

海水は Mg や Ca を含むため、アルカリ溶液中で水酸化物が生成し白色沈殿が生じ測定値や pH に影響を与える。そのため、海水測定に適した試薬量と微粒子添加量を検討した。水酸化リチウムを 50 mM から 180 mM に変えた結果、淡水と海水で同等な反応性が得られた。そして、水酸化リチウムの添加量に応じて pH 調整剤をリン酸塩の緩衝能を高めるために Na_2HPO_4 も加え、 H_3NSO_3 : PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) を 4 : 13 で混合し添加した。

7.3.4.6. 試料の種類によって得られる微粒子の添加量ごとの影響

微粒子の添加量を変え、捕集率と測定値に与える影響をみた。イオン強度により捕集率が変わるため蒸留水と人工海水で比較した (Fig. 7.3.4.6.-1)。Fig. 7.3.4.6.-1 (a) に蒸留水と人工海水で微粒子の添加量を変えて測定した様子を示した。各添加量ごとの捕集率を Fig. 7.3.4.6.-1 (b) に沈積した微粒子の添加量ごとの色調を Fig. 7.3.4.6.-1 (c) に示した。結果、蒸留水と人工海水で微粒子の添加量ごとに捕集率と色調が変化した。捕集率は 40 mg/mL 以上で一定となり蒸留水と人工海水で約 20% の差が生じた。吸着定数 (K_H) を算出したところ蒸留水は $K_H = 0.1228$ 、人工海水は $K_H = 0.0458$ であった。しかし、色調の変化は蒸留水と人工海水で 60 mg/mL 以降で緩やかに重なり、蒸留水と人工海水で測定値が一定となった。よって、イオン強度による影響は微粒子の添加量を変えることで低減することができ、微粒子の添加量が 80 mg/mL を最適とした。

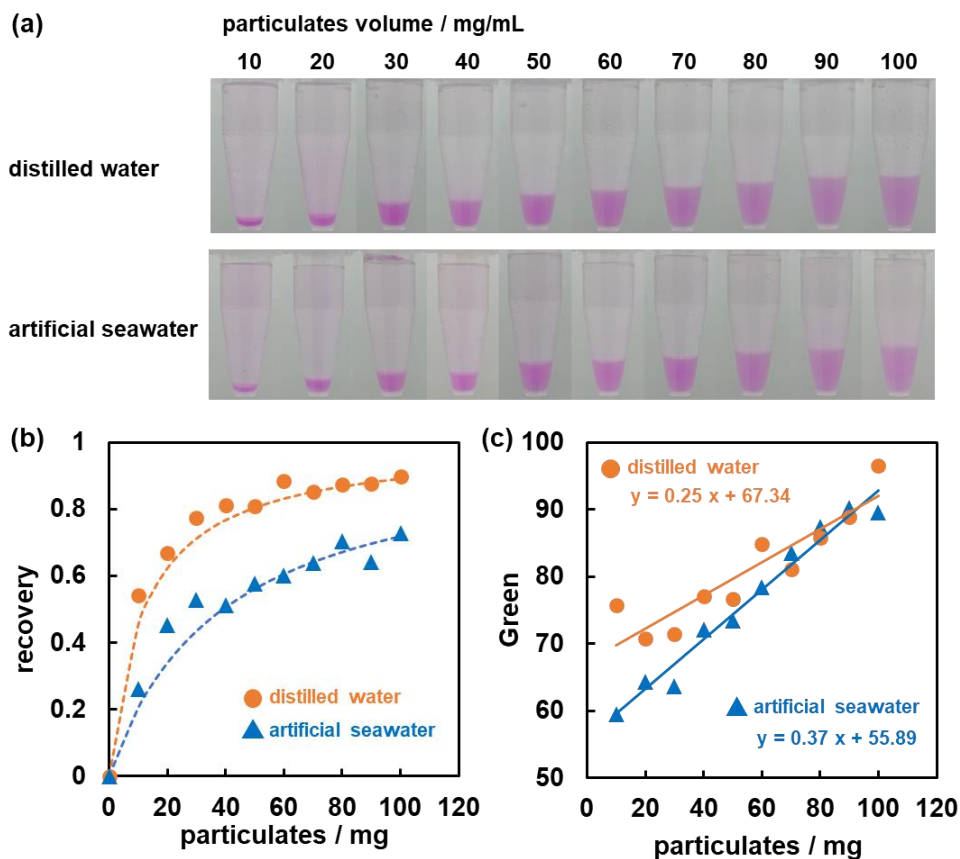


Fig. 7.3.4.6.-1 試料の種類（人工海水，蒸留水）ごとの微粒子の添加量の影響
 (a) 試料ごとの吸着した微粒子の色調の様子，(b) 試料ごとの捕集率の変化，(c) 試料ごとの色調（Green 値）の変化

7.3.4.7. 海水測定時の定量範囲

KMnO₄濃度を 0.04 mM，微粒子の添加量を 40 mg/0.5 mL とし，COD 10 mgO/L 以下を測定した。反応後のマイクロチューブに沈積した微粒子の写真（Fig. 7.3.4.7.-1 (a)）と沈積した微粒子を解析し検量線を示した（Fig. 7.3.4.7.-1 (b)）。画像解析では，Green/Red を用いて検量線を作成した。その結果， $y = -0.001x^2 + 0.021x + 0.738$ ， $R^2 = 0.813$ が得られた。目視では測定が困難な低濃度の測定を画像解析で測定することができる。人工海水と蒸留水で同じ検量線を利用することができる。

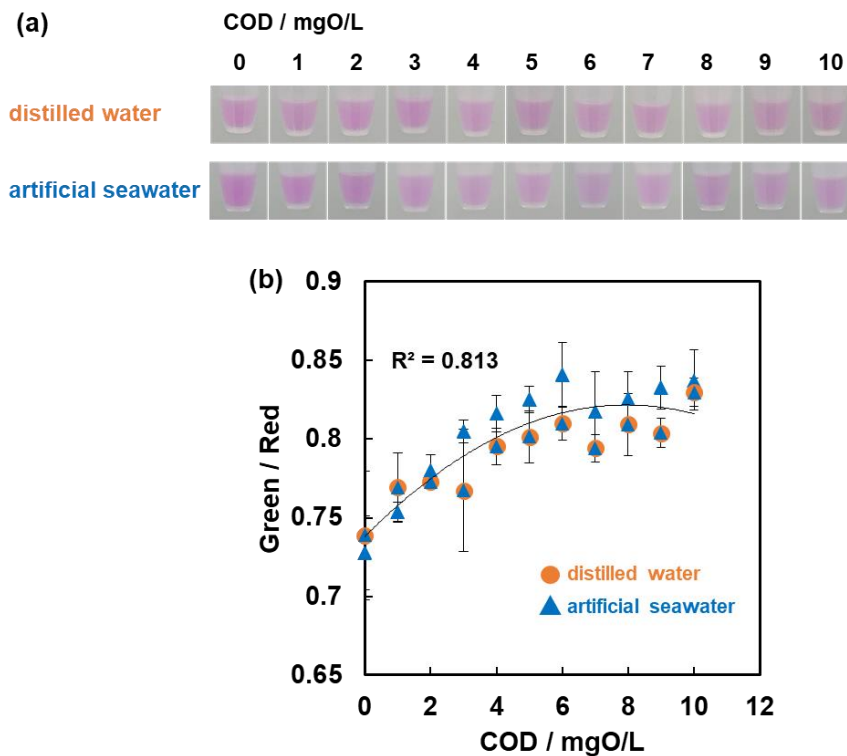


Fig. 7.3.4.7.-1 COD 値ごとの写真と画像解析で得られた検量線

(a) COD 値ごとの沈積した微粒子の写真, (b) 画像解析での検量線 (Green / Red)

7.3.4.8. 海水試料への応用

本法を9月と12月に富山県内の河川と漁港で採水した試料に応用した。採水した試料の測定結果を Table. 7.3.4.8.-1 に示す。電気伝導度から、淡水 (0.03~0.4 mS/cm)、汽水 (1~10 mS/cm)、海水 (2~50 mS/cm) とした。採水した時期で9月と12月の試料を比べたところ水温が 10 °C 低下し、酸化還元電位は12月に高くなり、酸化状態になっていると推測できる。これは、9月は暖かく、有機物の分解の進行によって酸素が消費されることで、還元状態になっているためであると考えられる [23]。測定法ごとの COD の結果を Table. 7.3.4.8.-2 に示した。公定法 (COD_{Mn}) は、塩化物イオンの影響を受けるため、硝酸銀 (淡水 1 g、汽水 5 g、海水 10 g) でマスキングし測定した。本法による測定は、現場で3回、実験室内で5回実施した。12月 (水温: 10 °C 前後) の現場での測定は反応時間を4分とした。汽水と海水の場合、卓上遠心分離機を用いて沈殿の分離を行った。パックテスト[®]は目視と iPhone のアプリ (スマートパックテスト) で測定した。

12月16日に採水した石畑池 (淡水)、少童橋 (汽水)、四方漁港 (海水) の試料にグルコースを添加し測定した (Table. 7.3.4.8-3)。標準添加法 (標準: グルコース) で COD_{Mn}

(Fig. 7.3.4.8.-1 (a)) と本法 (Fig. 7.3.4.8.-1 (b)) の関係をみたところ、傾きが COD_{Mn} は石畑池 $y = 0.82x + 3.30$, 少童橋 $y = 0.90x + 3.67$, 四方漁港 $y = 0.90x + 1.59$, 本法は石畑池 $y = 0.3x + 1.1$, 少童橋 $y = 0.3x + 1.3$, 四方漁港 $y = 0.3x + 0.9$ であった。本法の回収率が低い原因は不明であるが、本法は環境水の測定時に約 3 倍補正することで測定ができる。

Table. 7.3.4.8.-1 採水した試料の水質調査結果

sampling point		water temperature / °C	pH	EC / mS/cm	ORP / mV
21.9.15	石畑池	23	6.2	0.5	5
	悠基橋	25	6.6	4.0	9
	新湊港	25	7.9	30.2	12
	四方漁港	26	8.3	38.5	14
21.12.16	石畑池	10	6.0	0.3	208
	悠基橋	11	6.1	4.7	198
	新湊港	15	7.3	48.5	136
	四方漁港	15	7.7	50.7	114
	馬洗池	9	6.3	0.1	173
	少童橋	12	6.3	11.9	177

Table. 7.3.4.8.-2 水試料の COD 値測定結果

sampling point	COD _{Mn} / mgO/L (n=3)	this method / mgO/L (G/R)		pack test / mgO/L (n=3)	
		on-site (n=3)	lad (n=5)		
21.9.15	石畑池	5.02±0.25	0.9	4.3±1.1	7 (n=2)
	悠基橋	2.79±0.33	2.2±0.2	5.1±0.8	6 (n=2)
	新湊港	1.84±0.09	1.1±0.6	0.3±0.2	3 (n=2)
	四方漁港	3.36	1.8±0.3	1.5±1.6	1 (n=2)
21.12.16	石畑池	3.53±0.16	1.1±0.6	1.5±0.3	3±2
	悠基橋	3.22±0.35	0.3±0.3	0.9±0.8	2±1
	新湊港	2.09±0.11	-	0.9±0.4	2±1
	四方漁港	2.00±0.28	-	1.0±0.5	2±1
	馬洗池	3.31±0.15	1.3±0.5	1.1±0.6	3±0
	少童橋	3.92±0.36	0.6±1.2	1.5±0.4	4±0
	石畑池 (ろ過有り)	2.81±0.11	-	2.2±1.0	-
	馬洗池 (ろ過有り)	2.25±0.09	-	3.7±1.3	-

Table. 7.3.4.8-3 標準添加法による COD 測定結果

sampling point	added / mgO/L	COD _{Mn} / mgO/L (n=3)	this method / mgO/L (blank n=5, n=3)
石畑池	0.0	3.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3
	1.6	4.3 ± 0.3	0.7 ± 0.4
	2.6	5.4 ± 0.1	1.5 ± 0.5
	3.9	6.4 ± 0.1	2.1 ± 1.2
	4.9	7.5 ± 0.1	3.6 ± 1.7
少童橋	0.0	3.9 ± 0.4	1.5 ± 0.4
	1.6	4.8 ± 0.2	1.3 ± 0.7
	2.6	6.0 ± 0.1	1.1 ± 0.6
	3.9	7.1 ± 0.2	2.9 ± 1.2
	4.9	8.3 ± 0.3	2.6 ± 0.5
四方漁港	0.0	2.0 ± 0.3	1.0 ± 0.5
	1.6	2.6 ± 0.5	1.9 ± 0.6
	2.6	3.4 ± 0.3	2.2 ± 0.5
	3.9	5.6 ± 1.9	2.4 ± 1.6
	4.9	6.0 ± 0.3	0.5 ± 0.3

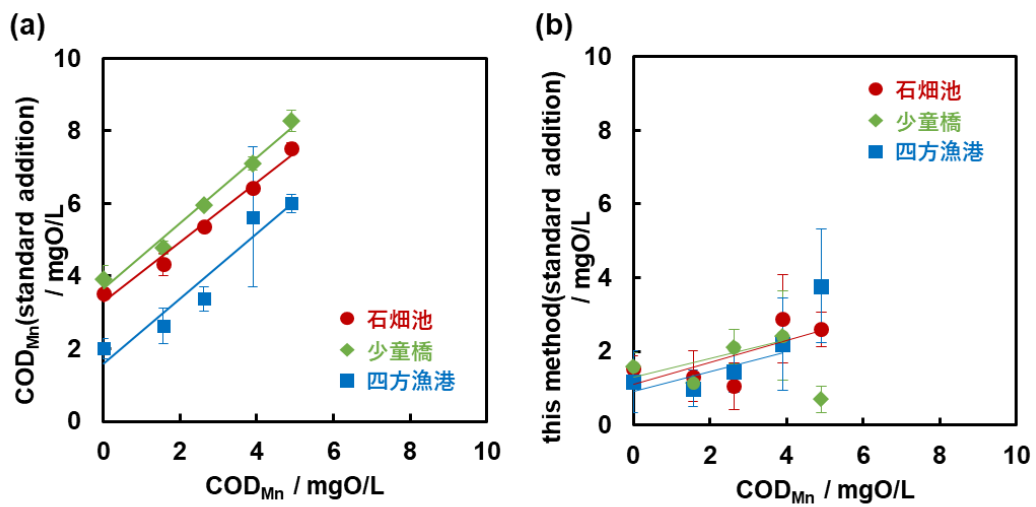


Fig. 7.3.4.8.-3 本法と公定法 (COD_{Mn}) の標準添加の結果

(a) 公定法 (COD_{Mn}) の標準添加, (b) 本法の標準添加

7.4. まとめ

本研究では、微粒子 ($(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$) による過マンガン酸イオン (赤紫色) の吸着を利用した Mn^{2+} と COD の分散微粒子抽出/簡易画像測色法を開発した。

過ヨウ素酸ナトリウムを用いて Mn^{2+} から MnO_4^- を生成し, $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ 30 mg に吸着させた (捕集率 > 70%)。その結果, 溶液のみの色変化と比較して約 10 倍の高感度化を達成し, 検出限界は 0.05 mg/L であった。更に, MnO_4^- の $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ への吸着機構を用いて, 有機物 (COD) の測定法に応用した。過マンガン酸カリウムを用いたアルカリ性常温法に分散微粒子抽出法のシステムを組み込み COD の測定をした。有機物を過マンガン酸イオン (予め容器に添加) で 3 分間酸化し, 溶液を中性に変え水相に残留した MnO_4^- を微粒子に吸着させて測定した。淡水・汽水・海水と幅広い水試料に応用するためには, アルカリ試薬の濃度や微粒子の添加量を変えることで, 同等の測定が可能である。本法は, 硝酸銀を必要とする公定法よりも非常に安価で迅速・簡便に測定することができる。

7.5. 参考文献

- [1] 村居 景太, 本多 宏子, 奥村 浩, 岡内 完治, *分析化学*, (2011), 60, 507-514.
<https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.60.507>
- [2] E. B. Sandell, *Colorimetric Determination of Traces of Metals*, (1944)
- [3] 青山 勲, *土壌の物理性*, (1993), 57, 11-18.
- [4] 上野 晋, 後藤 元秀, *産業医学レビュー*, (2021), 33, 251-262.
https://doi.org/10.34354/ohpfrev.33.3_251
- [5] G. シャルロー, *定性分析化学 II - 溶液中の化学反応-*, (1958)
- [6] 環境省環境保健部環境リスク評価室, *化学物質の環境リスク評価 (第 6 巻)*
- [7] Howe, Paul D, Malcolm, H. M, Dobson, Stuart, *World Health Organization & International Programme on Chemical Safety*. (2004). *Manganese and Its Compounds: Environmental Aspects*, World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42992>
- [8] マンガン, 厚生労働省,
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/index.html>
(Accessed 2022)
- [9] 平野 四蔵, *無機応用比色分析, 無機応用比色分析編集委員会*, (1974)
- [10] M. Pourbaix, H. Zhang, A. Pourbaix, *Mater. Sci. Forum*, (1997), 251-254, 143-148.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.251-254.143>
- [11] 中辻 啓二, 長坂 誠司, 村岡 浩爾, *水工学論文集*, (1991), 35, 603-608.
- [12] 生活環境の保全に関する環境基準 (海域), 環境省, <https://www.env.go.jp/kijun/wt2-2.html>

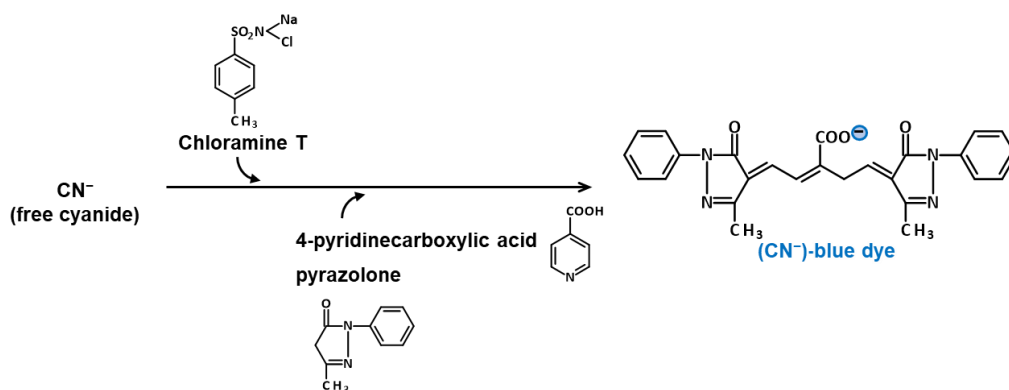
- (Accessed March 1, 2023)
- [13] 水浴場水質判定基準(別紙), 環境省, <https://www.env.go.jp/press/files/jp/9796.pdf> (Accessed March 1, 2023)
- [14] 生活環境の保全に関する環境基準(湖沼), 環境省, <https://www.env.go.jp/kijun/wt2-1-2.html> (Accessed March 1, 2023)
- [15] 山室 真澄, 神谷 宏, 石飛 裕, *水環境学会誌*, (2011), 34, 57-64. <https://doi.org/10.2965/jswe.34.57>
- [16] 大森 正男, *環境技術*, (1979), 8, 589-602. <https://doi.org/10.5956/jriet.8.589>
- [17] 石井 誠治, 浦野 紘平, *水環境学会誌*, (1999), 22, 301-307. <https://doi.org/10.2965/jswe.22.301>
- [18] 浦野 紘平, *水処理技術*, (2002), 43, 185-189.
- [19] 浦野 紘平, *水環境学会誌*, (2008), 31, 410-414.
- [20] 永川 元, *化学と教育*, (1993), 41, 762-765. https://doi.org/10.20665/kakyoshi.41.11_762
- [21] 気候変動による湖沼の水環境への影響評価・適応策検討に係る手引き, 環境省, https://www.env.go.jp/water/kosyou/post_88.html (Accessed March 1, 2023)
- [22] 釜田 淳平, 穴澤 活郎, 坂元 隼雄, 富安 卓滋, *分析化学*, (2006), 55, 815-819. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.55.815>
- [23] 河川水質試験方法(案)II 試験方法, 国土交通省, https://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/kasen/suishitsu/houhou.html (Accessed March 1, 2023)

第8章 遊離シアン化合物 (CN⁻) の簡易分析法の開発 —分散微粒子抽出法に適した小型撮影ボックスの開発—

8.1. はじめに

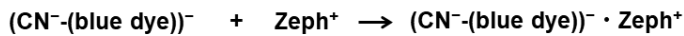
8.1.1. 本研究の捕集形態について

本研究では、ケーニッヒ反応を利用する 4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン吸光光度法を用いて遊離シアン (CN⁻) を測定した。本法の分析フローと呈色成分の吸着の仕組みを Scheme 8.1.1-1 に示す。CN⁻を 4-ピリジンカルボン酸とピラゾロンを反応させると青色の化合物が生成する。負電荷を持つ青色の化合物に対しイオンの臭化ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム (Zephiramine[®]) を添加しイオン対を形成させ、シリカゲル (Wakogel[®] C-300) によって捕集した (Scheme 8.1.1-2)。

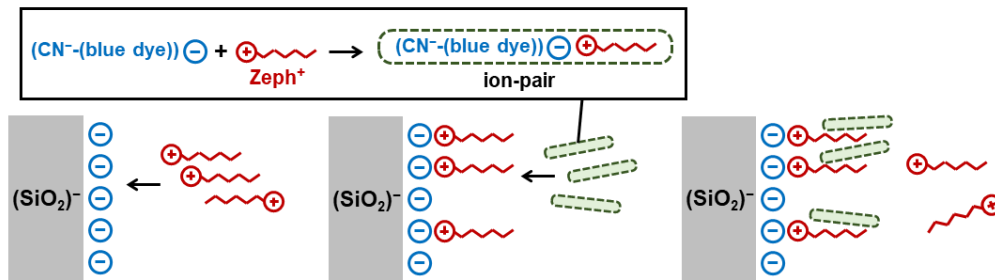
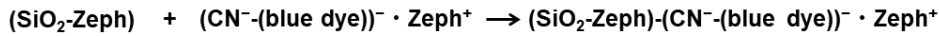
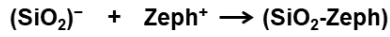


Scheme 8.1.1-1 遊離シアン (CN⁻) の呈色反応

ion pair formation



solid phase



Scheme 8.1.1-2 遊離シアン (CN⁻, CN⁻-(blue dye)) の捕集機構

8.1.2. シアン化合物について

シアン化合物は、工業プロセス（金採掘、電気メッキ、都市廃棄物の燃焼、殺虫剤など）の排出物から環境に流出し、地表水源や土壌を汚染する可能性がある[1, 2]。シアン化合物の中でも、シアン化物イオンとシアン化水素として存在する遊離シアン化物 (CN⁻) [3]は、金属と錯形成しやすく、低濃度でも毒性が強く、環境中に拡散すると、微量でも水生生物や微生物に影響を与える。WHO や EPA 等の国際機関や各国では様々なシアンの基準が制定されている[4, 5]。そのため、簡便に CN⁻を判定できる方法が求められこれまでに多く報告されている。

CN⁻ の測定法として、吸光光度法[6-8]からフローインジェクション[9-11]などの呈色反応を利用した機器分析法[12, 13]がある。また、簡便に測定できる目視やスマートフォンで比色する Spot-test[14-17]が用いられ蛍光法[18, 19]などで高感度化されている。

8.1.2. 現場分析のための携帯機器

比色法は、色を測定するため測定環境の条件によって測定値に強く影響される場合があり、測定できないことも想定される。測定する時間や測定環境（野外、屋内）が異なる現場分析では、測定環境を揃えることが難しく再現性のある測定が困難で、常にサンプルと標準を測定し補正する必要が生じる。そのため、測定法に適した測色方法が必要である。昨今では、分析機器の小型化が進みバッテリー式の機器や 3D プリンターを用いることで安価で容易に機器が改良されている[20-26]。そこで、現場での測定と再現性を高めるために可搬できる撮影ボックスを 3D プリンターで設計し、沈積した粒子をそのままスマートフォンで撮影し色情報を測定した。

8.2. 分析法の開発

8.2.1. 実験

8.2.1.1. 装置と試薬

2.4.3.1.1. 装置と試薬に実験に用いた装置及び画像解析ソフトを記載した。3D printer XYZ printing PRO, 3D printer Filament for da vinci ABS black を用いて携帯型撮影ボックスを設計した。シアン化カリウム, 4-ピリジンカルボン酸ナトリウム四水和物, 3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , HCl , NaOH , 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries., Ltd.), クロラミン T, 臭化ジドデシルジメチルアンモニウム (DDAB) (Sigma Aldrich., Ltd), 塩化ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム (Zephiramine[®] : Zeph⁺) (DOJINDO LABORATORIES., Ltd.)。試薬は、特級を使用し、全て超純水を用いて調製した。吸着剤として、Wakogel[®] C-300 (形状：全多孔性破碎型, 粒径：45~75 μm), Wakogel[®] 50 (エンドキャッピング済み, 粒径：40~63 μm) SAX (トリメチルアミノプロピル： $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$), Phenyl, C_8 (Octyl), を使用した。DOWEX[™] 1x8 (Cl^-) (200~400 mesh) 陰イオン交換樹脂, Amberlite[®] XAD-7HP (粒径：20~60 mesh), を使用した。各吸着剤は、水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。XAD-7HP 樹脂は、乳鉢で粉碎した後、沈降法で粒径 ($0.36 \pm 0.10 \text{ mm}$) を揃え室温で乾燥させたものを使用した。

8.2.1.2. 確立した測定方法

CN⁻の確定した分析操作を示した。

クロラミン T とリン酸塩 (pH 7.2) を添加した 1.5 mL マイクロチューブに試料 1 mL を添加し攪拌した。その後、4-ピリジルカルボン酸と 3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン、10 mg の吸着微粒子 (シリカゲル(SiO₂)), 0.5 mM の Zeph⁺を添加し、マイクロチューブを 30 秒間軽く振り混ぜ 7 分間反応させ生成した色素を SiO₂ に捕集した。その後、沈積した粒子の色調から CN⁻の濃度を求めた。また、携帯型撮影ボックスに入れスマートフォンで撮影し ImageJ で Blue/(Red+Green+Blue)値を測定した。

8.2.2. 結果と考察

8.2.2.1. 現場分析に適した装置と測色法の開発

現場分析において、大掛かりな機器を使用することや電源を確保することは困難である。そのため、現場に適した測定機器が必要である。そのためにこれまでに、小型化した測定機器が開発されている [26]。比色を用いた画像解析は、正確なデータを得るために、撮影環境をそろえる必要がある。また、分析機構に適した測色法が感度や精度を向上させるために必要である。しかし、現場では電源が必要で複数の機器を組み合わせることが困難である。小型の機器の開発には安価で設計が容易なことから 3D プリンターを用いられている。そこで、本研究では本分析原理に適した現場分析のための撮影ボックスを 3D プリンターで設計した。携帯型撮影ボックスの特性を評価するためにメチレンブルー (MB) と SiO₂を用いた。メチレンブルーは発色が安定で正電荷の色素で、表面が負に帯電した SiO₂によく吸着する。

現場で使える携帯型撮影ボックスの設計のコンセプトは以下の通りである。

- (1) 持ち運びに便利な小型軽量
- (2) 外光の影響を受けない
- (3) バッテリー電源の LED 光源
- (4) 光源の取り替えが可能
- (5) 1.5mL マイクロチューブ用のスペースを備える

8.2.2.1.1. 3D プリンターを使った撮影ボックスの開発

作製した携帯型撮影ボックス (Portable shooting box) の概略を Fig. 8.2.2.1.-1 に示す。1.5 mL チューブに適したモバイル型撮影ボックスを 3D プリンターで作製した。このボックスは試料を入れる部屋と光源を入れる部屋の 2 層構造になっている。1.5 mL チューブを上部の試料セルに差し込み、下部から白色光を照射する。写真の撮影は、上部の試料セルに開けた撮影窓から光と直角方向からスマートフォンで撮影した。作製した携帯型撮影ボックスは、試料セルと光源セルの 2 層構造で電池式 LED 光源を使用する。試料に対して低部から光を照射し、直角方向から検出する特徴を持つ。

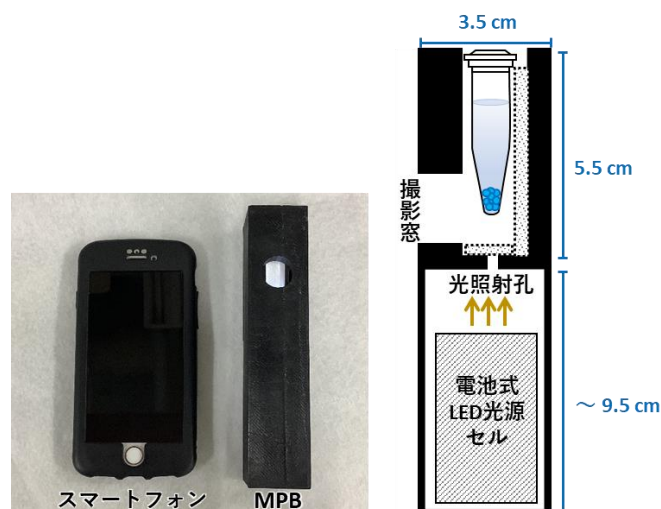


Fig. 8.2.2.1.-1 携帯型撮影ボックス (Portable shooting box) の写真と概略図

8.2.2.1.2. 携帯型撮影ボックスの諸条件の検討

試料室内部は光源を均一に拡散させるために携帯型撮影ボックスの試料セル内部に拡散板を設置した。光の拡散板として壁面を白と黒にスプレーで塗布し検討した (Fig. 8.2.2.1.2.-1)。Fig. 8.2.2.1.2.-1 (a) に測定時の写真, Fig. 8.2.2.1.2.-1 (b) に沈積物の色の強度を算出した結果を示した。結果, 壁面の色が白の方が感度や精度が優れていた。黒色よりも白色の方が光の拡散性が良いため均一に 1.5 mL チューブに沈積した微粒子に光が当たるため感度が良くなったと考えられる。

光源の光量による測定値への影響をみるために光量を変えて測定値を比較した (Fig. 8.2.2.1.2.-2)。MB 添加なし (Fig. 8.2.2.1.2.-2 (a)) と MB 2.0 μM (Fig. 8.2.2.1.2.-2 (b)) で比較したところそれぞれ光量の増減による測定値の影響は低かった。また, バッテリー

式の LED 光源の光量 (Fig. 8.2.2.1.2.-2 (グレーエリア)) でも安定であることから光源にバッテリー式の LED 光源を用いることができる。

携帯型撮影ボックスは設計上、光源が下から照射される。そのため沈積した微粒子に光源の照射方向に由来したグラデーションが生じる。そのため、1 pixel でのポイントでの色情報の抽出は場所ごとに感度が異なる (Fig. 8.2.2.1.2.-3)。本デバイスは、横方向 (Fig. 8.2.2.1.2.-3 (b)) より縦方向 (Fig. 8.2.2.1.2.-3 (a)) のばらつきが大きい。そのため沈積した微粒子の上下左右の広範囲 (200×200 pixel) の平均値から数値を算出することにした。

携帯型撮影ボックスと市販の撮影ボックスで MB を捕集した時の測定値の比較をした (Fig. 8.2.2.1.2.-4)。Fig. 8.2.2.1.2.-4 (a) に携帯型撮影ボックスと市販の撮影ボックスを使った時のそれぞれの写真を示し、Fig. 8.2.2.1.2.-4 (b) に沈積した微粒子の画像解析の結果を示した。沈積した微粒子の中心から 200×200 pixel のエリアを指定し色情報を抽出し平均値を算出することで、撮影方法ごとに同等の感度、直線性が得られた。MB 濃度 0.5 μM で RSD (n=3) は市販の撮影ボックスを用いた場合で 0.28%, 携帯型撮影ボックスで 0.33% であり CN⁻-(blue dye) と同様に同等の感度、直線性が得られることを確認した (Fig. 8.2.2.1.2.-5)。

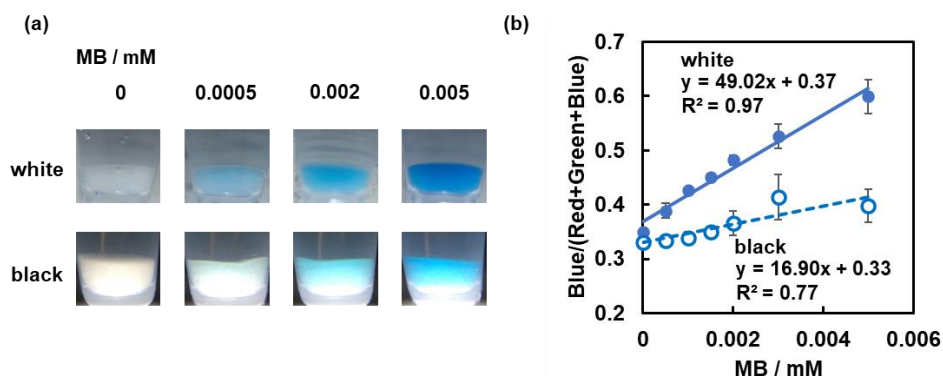


Fig. 8.2.2.1.2.-1 携帯型撮影ボックスの試料セルの壁面の色による影響

(a) 壁面の色ごとの様子, (b) 壁面の色ごとに画像解析した結果 (●: 白背景, ○: 黒背景)

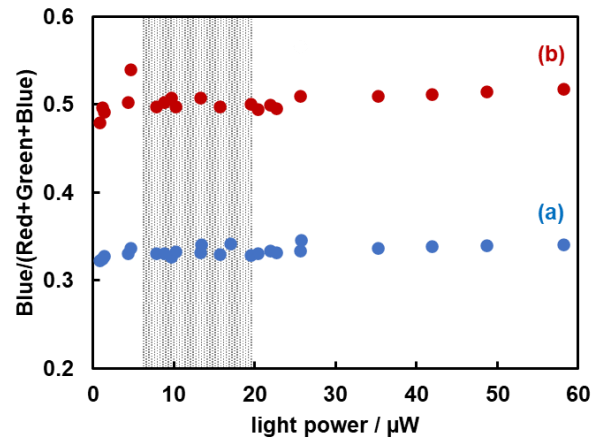


Fig. 8.2.2.1.2.-2 光源の光量による測定値への影響
 (a) MB 添加なし, (b) MB 2.0 μM , (グレーエリア: バッテリー式の LED 光源の光量)

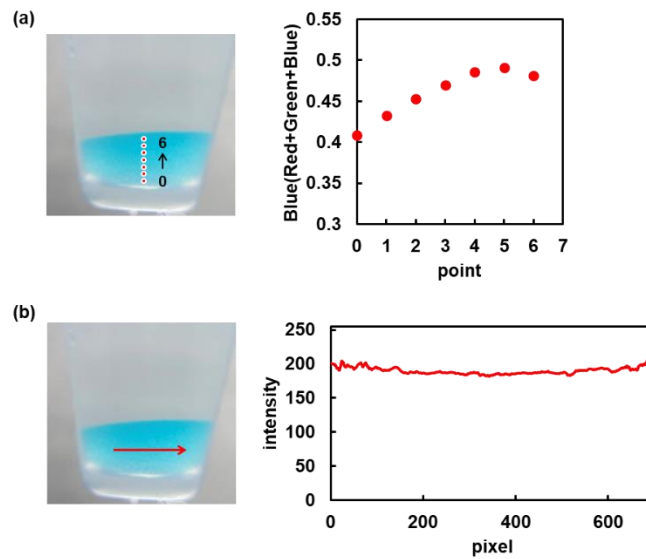


Fig. 8.2.2.1.2.-3 沈積した微粒子の場所ごとの数値のばらつき
 (a) 縦方向での測定の様子と測定値, (b) 横方向での測定の様子と測定値

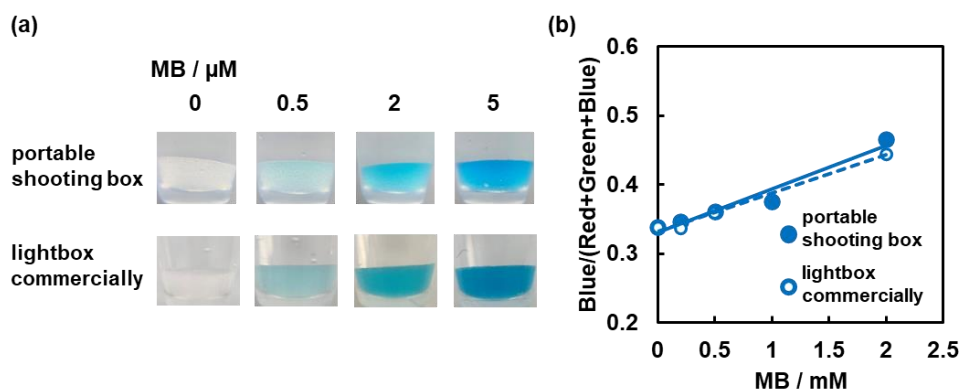


Fig. 8.2.2.1.2.-4 撮影方法ごとの MB を捕集した時の測定値の比較

(a) 携帯型撮影ボックスと市販の撮影ボックスを使って撮影したそれぞれの写真, (b) 沈積した微粒子の画像解析の結果 (● : portable shooting box, ○ : lightbox commercially)

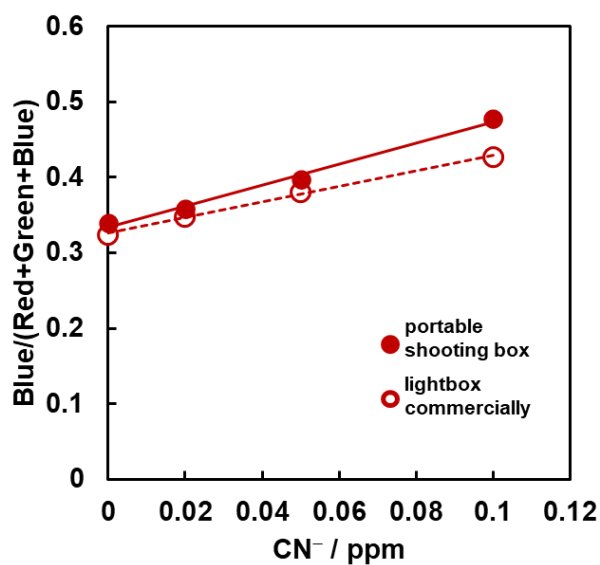


Fig. 8.2.2.1.2.-5 撮影方法ごとの CN⁻-(blue dye)を捕集した時の測定値の比較 (● : portable shooting box, ○ : lightbox commercially)

8.2.2.1.3. 有色成分の測定値への影響

興味深いことに水相に有色のタートラジン(陰イオン色素)を添加し、溶液に色を付けて測定したところ、市販の撮影ボックスで撮影した場合 (Fig. 8.2.2.1.3.-1 (a)), 微粒子に溶液の色が妨害し測定値に影響していたが携帯型撮影ボックスで撮影した場合 (Fig. 8.2.2.1.3.-1 (b)), 溶液の影響をあまり受けずに撮影することができた。一定方向(下)から微粒子の散乱を測定できる光量を照射することで、溶液の色による光の妨害を低減することができると考えられる。

撮影方法で生じる色調の違いの仕組みについて考察した。まず、本法で検出されている光は、多重散乱光と反射光が合わさったものであると考えられる。そのためどちらの方法も同じ光を検出する。しかし、携帯型撮影ボックスのように粒子の近くで強く光を当てることで、反射光よりも多重散乱光が多く検出され、わずかに色調が変化すると考えられる (Fig. 8.2.2.1.3.-2)。そして、溶液中に色がある場合、様々な方向から光を照射すると、水相を通過した光も検出されるため溶液の色の影響が出る。しかし、携帯型撮影ボックスのように下から光を当てて、直角方向から撮影することで水相を通過した光が少なくなることで溶液の色の影響を小さくすることができる (Fig. 8.2.2.1.3.-3)。

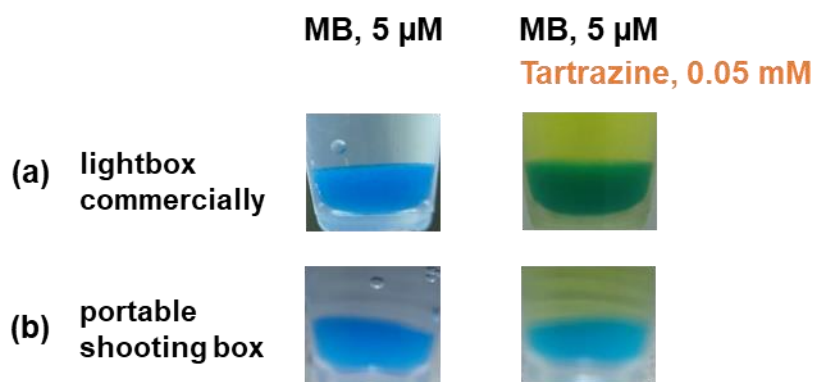
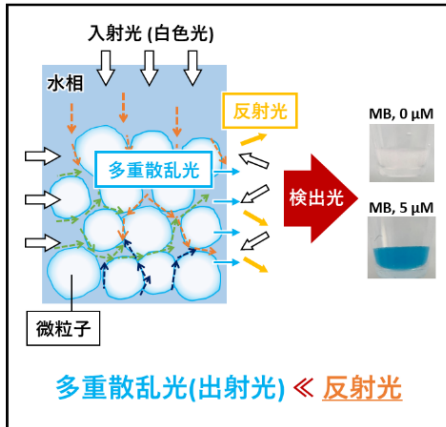


Fig. 8.2.2.1.3.-1 有色成分存在下での測定の比較

(a) 市販の撮影ボックスでの有色成分存在下の写真, (b) 携帯型撮影ボックスでの有色成分存在下の写真

■ 据え置き型：多方向からの光照射



■ MPB：底部(一方法)からの光照射

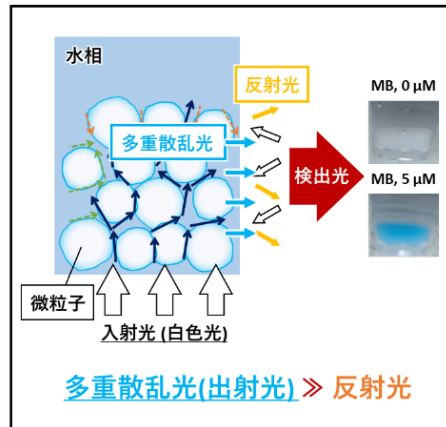
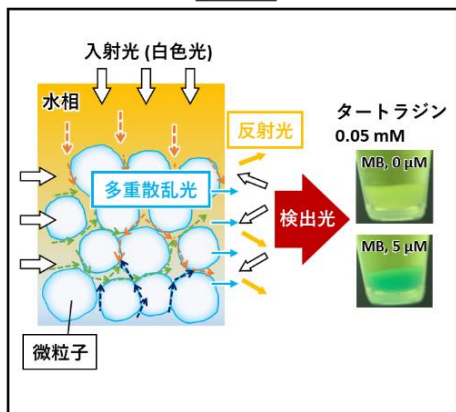


Fig. 8.2.2.1.3.-2 光の照射位置と検出角度による検出のモデル①

■ 据え置き型：多方向からの光照射



■ MPB：底部(一方向)からの光照射

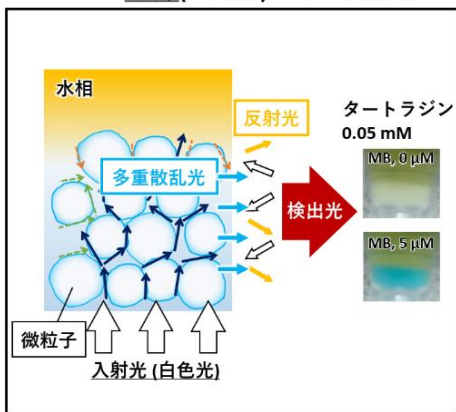


Fig. 8.2.2.1.3.-3 光の照射位置と検出角度による検出のモデル②

8.2.2.2. CN⁻の簡易分析法の開発

8.2.2.2.1. 吸着機構の検討

(1) イオン交換による吸着

CN⁻由来の色素 ((CN⁻)-blue dye) の電荷は、固相抽出システムを構築し、分析条件を最適化するための最も重要なパラメーターである。(CN⁻)-blue dye は、負電荷を持つことが報告されている [27]。したがって、本研究では、イオン交換モードのアプリケーションを最初に調査した。2 種類の陰イオン交換体 (prima: DOWEX™ 1x8 (Cl⁻), シリカ: Wakogel® 50SAX ((SiO₂)-R₃NH₃⁺) を調べた。Fig. 8.2.2.2.1.-1 は、(CN⁻)-blue dye を吸着した(a) DOWEX™ 1x8 (Cl⁻)と (b) (SiO₂)-R₃NH₃⁺ 10 mg の沈殿物の写真を示す。水相の分光測光法による捕集率はそれぞれ 87%と 54%であった。DOWEX™ 1x8 (Cl⁻)は(SiO₂)-R₃NH₃⁺よりも高い捕集率を示したが、残念なことに陰イオン交換体の黄色が、目視での比色と画像での比色の測定を妨げた。したがって、陰イオン成分の他の捕集機構を検討した。

(2) イオン対抽出による吸着

目的成分の形態に合わせて吸着剤を選択していたが、本研究では目的成分の組成を変えることで吸着剤との親和性を高め捕集率の向上をはかった。そこで、イオン対抽出を使った吸着システムに変更した。第 6 章では、[Cr-(DPC)₃] 錯体に対しイオンとして陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムを添加しイオン対を生成、中極性の XAD-7HP 樹脂に捕集した。

本研究では、吸着剤として中極性の樹脂である XAD-7HP、フェニル基、オクチル基を修飾した SiO₂ の 3 種類で検討した。対イオンとして側鎖の異なる 3 種類 (Zeph⁺, CTAB, DDAB) で検討した (Fig. 8.2.2.2.1.-2)。対イオンの濃度が高くなるに従って、3 種類の吸着剤の捕集率は上昇し、一定の濃度以上では捕集率が減少した。これは添加した対イオンの臨界ミセル濃度 (CMC) が影響していると考えられる [28-30]。CMC 以上では、水相内で形成したミセルと微粒子へのイオン対の捕集が競合し捕集率の低下につながったと考えられる。

対イオンの中でも Zeph⁺を添加した場合、0.5 mM 以上で吸着が安定であった。その中で最も XAD-7HP 樹脂の捕集率が高く安定であった。しかし、XAD-7HP 樹脂を携帯型撮影ボックスで写真を撮影し色情報 (Blue/(Red+Green+Blue)) を測定したところ感度が低く、精度が悪かった (Fig. 8.2.2.2.1.-3 (b))。吸着剤の材質による光の透過性で検出感度が変化したと考えられる。そこで吸着剤の透過性の高い SiO₂ 基盤の吸着剤に着目した。第 5 章で最適な吸着剤を検討するために SiO₂ に陽イオン界面活性剤をコーティングすることで SiO₂ の表面状態を変化させて捕集効率の増加を図った。そこで、対イオンとして陽イオン界面活性剤を過剰に添加することを利用して、SiO₂ への (CN⁻)-blue dye のイオン対の捕集を試みた。結果、対イオンとして Zeph⁺ 0.5 mM を添加することで 90%以上の捕集率が得られ

た (Fig. 8.2.2.2.1.-2 (a))。また、色素捕集時の SiO_2 の色情報 (Blue/(Red+Green+Blue)) の感度も良好であった (Fig. 8.2.2.2.1.-3 (a))。 SiO_2 を優れた捕集率と感度のために選択した。

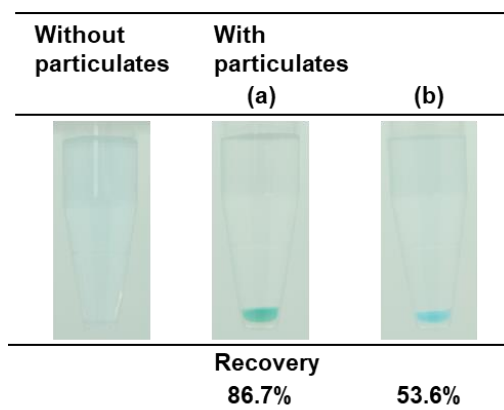


Fig. 8.2.2.2.1.-1 イオン交換による CN^- -(blue dye)の捕集

(a) CN^- -blue dye を吸着した DOWEX™ 1x8 (Cl^-) (10 mg), (b) CN^- -blue dye を吸着した $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ (10 mg)

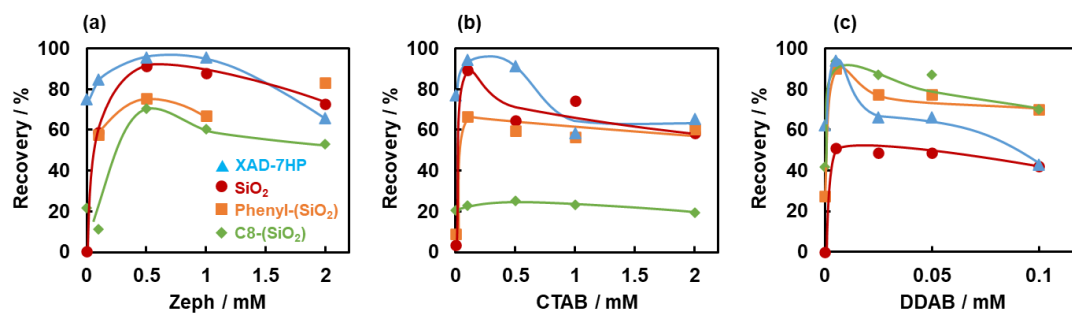


Fig. 8.2.2.2.1.-2 対イオンの種類と濃度の CN^- -(blue dye)の捕集に与える影響

(a) 対イオンとして Zeph^+ の場合, (b) 対イオンとして CTAB の場合, (c) 対イオンとして DDAB の場合

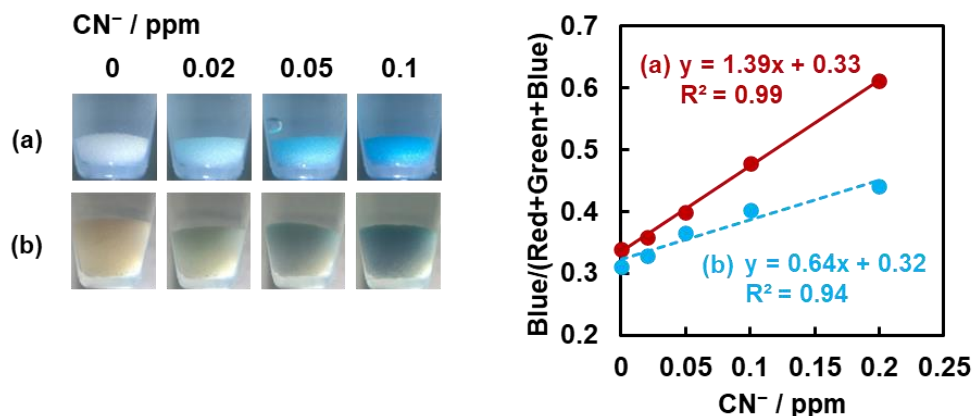


Fig. 8.2.2.2.1.-3 携帯型撮影ボックスでの測定値の微粒子ごとの比較
(a) SiO_2 の場合, (b) XAD-7HP の場合

8.2.2.2.2. 呈色速度と測定時間

CN^- の安定な呈色には 30 分程度時間がかかることが知られている。また、呈色反応に用いた試薬は水への溶解度が低い。一般的に本法の呈色試薬は加熱した水または有機溶媒で溶解して使用する。しかし、現場分析のための簡易分析では加熱や有機溶媒の使用は困難であるため、本法では加熱や有機溶媒を使用せずに水のみを使用した。本法の測定時間は、目的成分の呈色時間にも影響を受けるため、イオン対抽出で CN^- 色素を捕集することから、対イオンの添加の有無で呈色時間への影響をみた。

CN^- 0.5 mg/L の時の時間ごとの呈色反応を溶液は吸光度で吸着剤の沈積物は画像解析で測定した (Fig. 8.2.2.2.2.-1)。時間に伴う呈色変化の写真を Fig. 8.2.2.2.2.-2 に示した。結果、対イオンとして Zeph+ 0.5 mM を添加しない場合 (Fig. 8.2.2.2.2.-1 青点線)、反応が緩やかに進み 15 分以降も呈色が安定しない。Zeph+ 0.5 mM を添加した場合 (Fig. 8.2.2.2.2.-1 青線)、10 分以降は呈色が安定し、添加なしと比較して早く一定になった。この呈色反応への影響はまだわかっていないが、臨界ミセル濃度以上の高濃度の界面活性剤を添加することで、ミセル上で溶解し試薬の分散性が向上したことが影響しているのではないかと考えられる。更に SiO_2 10 mg を添加した場合 (Fig. 8.2.2.2.2.-1 赤線)、7 分以降と水相の反応よりも早く呈色が安定した。本法は 10 分以内に CN^- の測定が完了する。

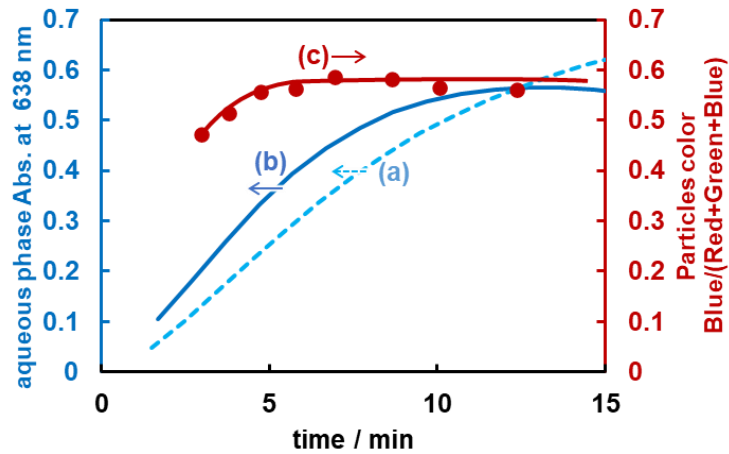


Fig. 8.2.2.2.2-1 CN^- -(blue dye)の時間ごとの呈色反応の水相と微粒子の比較
 (a, 青点線) 対イオンとして Zeph⁺ 0.5 mM を添加しない場合 (水相) (b, 青線) 対イオンとして Zeph⁺ 0.5 mM を添加した場合, (c, 赤線) 微粒子を添加した場合 (水相は吸光度, 微粒子の色は画像解析で測定した)

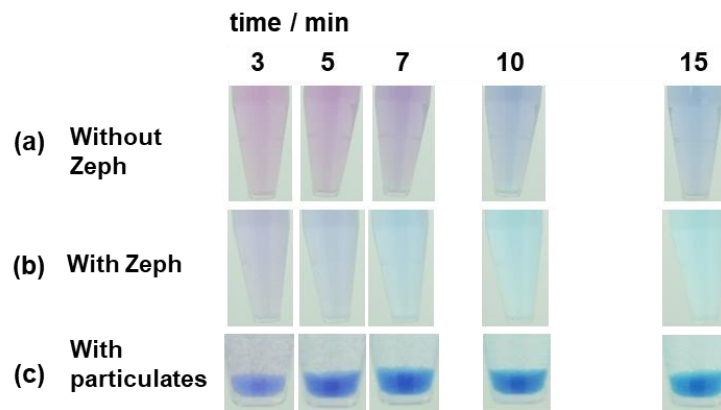


Fig. 8.2.2.2.2-2 CN^- -(blue dye)の時間ごとの呈色反応の水相と微粒子の写真
 (a) 対イオンとして Zeph⁺ 0.5 mM を添加しない場合 (水相) (b) 対イオンとして Zeph⁺ 0.5 mM を添加した場合, (c) 微粒子を添加した場合

8.2.2.2.3. 携帯型撮影ボックスを使った CN^- の測定

Fig. 8.2.2.2.3.-1 (a) に、0~0.5 mg/L の CN^- のマイクロチューブの写真を示した。微粒子を添加し、沈積した微粒子（固相）の色調の強度を ImageJ のソフトウェアで測定した。画像解析では、Red, Green, Blue, Gray の値を測定した。測定方法の詳細は下に示す。得られた色調の数値の和で各色調の数値の商を算出したところ、 CN^- 濃度に応じた青色の化合物の変化は $\text{Blue}/(\text{Red}+\text{Green}+\text{Blue})$ 値が高感度であった。Fig. 8.2.2.2.3.-1 (a) から目視比色法で 0.02~0.5 mg/L で判定可能であった。画像測色法の結果から 0.005~0.1 mg/L で $y = 2.24x + 0.36$, $R^2 = 0.99$ の検量線が得られた(Fig. 8.2.2.2.3.-1 (b))。検出限界は 1.5 $\mu\text{g/L}$ ($3\sigma_B$) であった。本法の感度は、水道水質基準（検出されない(<0.01 mg/L)) よりも低濃度の CN^- を測定することができた。

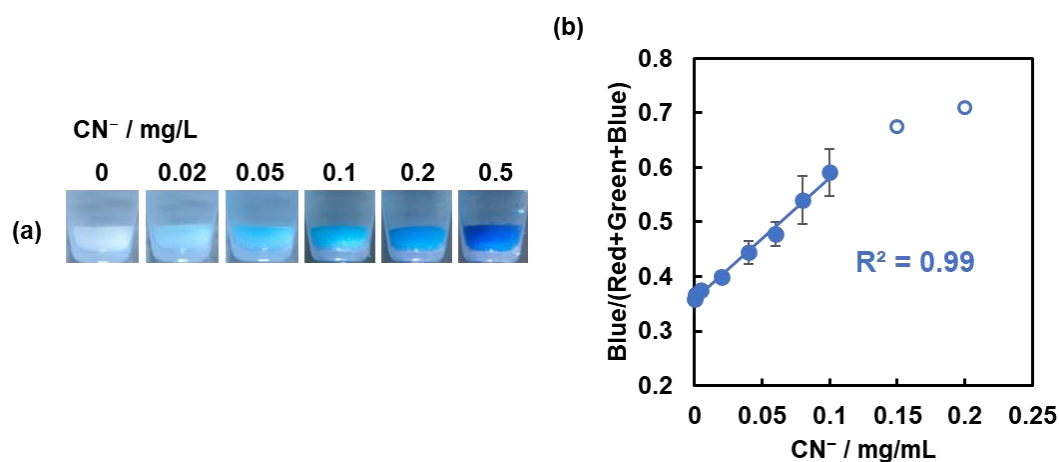


Fig. 8.2.2.2.3.-1 CN^- 濃度ごとの写真と画像解析で得られた検量線

(a) CN^- 濃度ごとのマイクロチューブの写真, (b) 沈積した微粒子の画像解析による検量線

8.2.2.2.4. 干渉成分の検討

工場排水で共存しうる成分を添加し、0.05 mg/L の CN^- の捕集率を測定した (Table. 8.2.2.2.4.-1)。 CN^- は金属と錯体を形成しやすいため、 Ag^+ , Co^{2+} , は少量でも呈色反応に影響し測定できなかった。 Zn^{2+} , Cr^{3+} は高濃度共存下でも良好な捕集率が得られた。また、陰イオン存在下でも対イオンとの競合が小さく測定でき、クエン酸ナトリウムは希釈することで測定できた。本法は、錯体を形成したシアン化合物とは反応しないため、遊離シアンのみを測定することが可能である。

Table. 8.2.2.2.4.-1 添加した試薬と CN⁻-(blue dye)の捕集率に与える影響

Ion	Added / mg/L	Recovery / %			
none	-	100.0	±	20.0	
Ag ⁺	5			n.d.	
Co ²⁺	10			n.d.	
Cu ²⁺	30	9.6	±	19.9	
Zn ²⁺	100	89.0	±	12.5	
Cr ³⁺	100	96.5	±	3.0	
NO ₃ ⁻	600	91.6	±	21.5	
SO ₄ ²⁻	15	91.6	±	21.5	
sodium citrate	40 M	22.2	±	2.8	
	4 mM	96.2	±	2.8	
glucose	100	91.6	±	21.5	

8.2.2.2.5. 水道水と地下水への応用

地下水と水道水を用いてこの方法を検証した (Table. 8.2.2.2.5.-1)。どちらも蒸留水への添加と比較して 90%程度の回収率が得られ、4.4%と 13%の誤差で測定できる。

Table. 8.2.2.2.5.-1 実試料への応用

sample	residual chlorine / mg/L	Added CN ⁻ / mg/L	Recovery / %		
groundwater	0.2	0.05	93.3	±	4.4
tap water	0.4	0.05	91.7	±	13.0

8.3. まとめ

一般的に固相抽出で色を測定する場合、固相に捕集した着色成分を微量な溶媒に溶出させ、その溶出液を吸光光度計で測定する。または、膜捕集のようにフィルターに捕集した場合、X 線や反射吸光度計で測定する。これまでの分散微粒子抽出法も撮影ボックス内で均一に光をマイクロチューブに照射してそのまま撮影し画像解析で測定していた。しかし、今回新たに開発した測色方法は、下方向から光を照射し直角方向から撮影 (検出) し、粒子に捕集した目的成分の色調を直接図る方法である。3D プリンターで作製した携帯型撮影ボックスを使った測色法の特徴は以下の通りである。(1)携帯性 (電池で稼働) に優れる。(2)感度、再現性に優れる。(3)着色成分の影響を受けにくい。

開発した測色法をシアンの簡易分析法に応用した。結果、従来法 (吸光光度法, 30 分) よりも短時間 (10 分以内) で、高感度 (検出限界: 0.005 mg/L) に測定できた。そのため遊離シアンの高感度分析への応用を達成した。

8.4. 参考文献

- [1] Dzombak, D.A., Ghosh, R.S., & Wong-Chong, G.M. 1st ed, (2005). Cyanide in Water and Soil: Chemistry, Risk, and Management <https://doi.org/10.1201/9781420032079>
- [2] D. B. Donato, O. Nichols, H. Possingham, M. Moore, P. F. Ricci, B. N. Noller, *Environ. Int.*, (2007), 33, 974-984. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2007.04.007>
- [3] Cyanide in freshwater and marine water, (2000). <https://www.waterquality.gov.au/anz-guidelines/guideline-values/default/water-quality-toxicants/toxicants/cyanide-2000> (Accessed January 16, 2023)
- [4] WHO, Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first and second addenda, World Heal. Organ. (2022)
- [5] J. Taylor, S. R. Corporation, U. States, Toxicological Profile for Cyanide, (2006)
- [6] R. Rubio, M.T. Galceran, G. Rauret, *Analyst*, (1990), 115, 959-963. <https://doi.org/10.1039/AN9901500959>
- [7] T. Ohno, *Analyst*, (1989), 114, 857-858. <https://doi.org/10.1039/AN9891400857>
- [8] N. J. Csikai, A. J. Barnard, *Anal. Chem.*, (1983), 55, 1677-1682. <https://doi.org/10.1021/AC00261A009>
- [9] J. C. L. Meeussen, M. G. Keizer, W. D. Lukassen, *Analyst*, (1992), 117, 1009-1012. <https://doi.org/10.1039/AN9921701009>
- [10] J. C. L. Meeussen, E. J. M. Temminghoff, M. G. Keizer, I. Novozamsky, *Analyst*, (1989), 114, 959-963. <https://doi.org/10.1039/AN9891400959>
- [11] A. Rios, M. D. L. de Castro, M. Valcarcel, *Talanta*, (1984), 31, 673-678. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(84\)80148-4](https://doi.org/10.1016/0039-9140(84)80148-4)
- [12] K. Nagashima, H. Horie, S. Suzuki, *Anal. Sci.*, (1986), 2, 271-274. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.2.271>
- [13] J. Ma, P. K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta.*, (2010), 673, 117-125. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2010.05.042>
- [14] J. A. D. Favero, M. Tubino, *Anal. Sci.*, (2003), 19, 1139-1144. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.19.1139>
- [15] N. Malahom, P. Jarujamrus, W. Anutrasakda, A. Siripinyanond, M. Amatatongchai, D. Citterio, D. Nacapricha, *Sensors Actuators B Chem.*, (2022), 356, 131351. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2021.131351>
- [16] S. Ramesh, S. Kumaresan, *Microchem. J.*, (2021), 169, 106584. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.106584>
- [17] W. A. Dunn, T. J. Siek, *J. Anal. Toxicol.*, (1990), 14, 256. <https://doi.org/10.1093/JAT/14.4.256>
- [18] X. Cheng, R. Tang, H. Jia, J. Feng, J. Qin, Z. Li, *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, (2012), 4, 4387-

4392. <https://doi.org/10.1021/AM3010412>
- [19] S. Pengpumkiat, Y. Wu, S. Sumantakul, V.T. Remcho, *Anal. Sci.*, (2020), 36, 193-197.
<https://doi.org/10.2116/ANALSCI.19P267>
- [20] A. Kumar, M. Thirumal, S. Kumar, *J. Mol. Struct.*, (2021), 1242, 130757.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2021.130757>
- [21] Y. Hasegawa, Y. Suzuki, S. Kawakubo, *Anal. Sci.*, (2017), 33, 859-862.
<https://doi.org/10.2116/ANALSCI.33.859>
- [22] Y. Suzuki, T. Aruga, H. Kuwahara, M. Kitamura, T. Kuwabara, S. Kawakubo, M. Iwatsuki, *Anal. Sci.*, (2004), 20, 975-977. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.20.975>
- [23] S. Jambunathan, P. K. Dasgupta, D. K. Wolcott, G. D. Marshall, D. C. Olson, *Talanta*, (1999), 50, 481-490. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00132-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00132-0)
- [24] J. Yang, K. Wang, H. Xu, W. Yan, Q. Jin, D. Cui, *Talanta*, (2019), 202, 96-110.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.054>
- [25] G. M. Fernandes, W. R. Silva, D. N. Barreto, R. S. Lamarca, P. C. F. Lima Gomes, J. F. S. Petrucci, A. D. Batista, *Anal. Chim. Acta*, (2020), 1135, 187-203.
<https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.07.030>
- [26] M. A. Vargas-Muñoz, K. Danchana, V. Cerdà, E. Palacio, *Microchem. J.*, (2021), 170, 106774.
<https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.106774>
- [27] F. W. Gilcreas, Standard methods for the examination of water and waste water, *Am. J. Public Health Nations. Health*, (1966), 56, 387-388. <https://doi.org/10.2105/AJPH.56.3.387>
- [28] G. Tsagkaropoulou, F. J. Allen, S. M. Clarke, P. J. Camp, *Soft Matter*, (2019), 15, 8402-8411.
<https://doi.org/10.1039/C9SM01464K>
- [29] L. R. Griffin, K. L. Browning, C. L. Truscott, L. A. Clifton, J. Webster, S. M. Clarke, *J. Colloid Interface Sci.*, (2016), 478, 365-373. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2016.06.015>
- [30] T. Kawashima, H. Itabashi, N. Teshima, M. Kurihara, S. Nakano, *Anal. Sci.*, (1999), 15, 835-839.
<https://doi.org/10.2116/ANALSCI.15.835>

第9章 蛍光測定法への応用

—微粒子への蛍光体の吸着と蛍光画像測色法—

9.1. はじめに

蛍光法は高感度であるため、環境や生体試料等の分析に汎用されている。本研究では、微粒子へ捕集した蛍光物質の高感度な簡易画像測色法の開発を目指し、レゾルフィン（蛍光物質）の微粒子への吸着挙動を調べると共に定量条件を検討した。

9.1.1. 本研究の捕集形態について

本法の呈色成分の吸着の仕組みを示す。本研究では、蛍光体色素のレゾルフィンを用いて蛍光法の応用をした[1, 2]。負電荷を持つレゾルフィン（蛍光体）に対しイオンの Zephiramine® (Zeph⁺) を添加しイオン対を形成させ、シリカゲル (SiO₂) へ疎水性相互作用によって捕集した。

9.1.2. 蛍光測定法

紫外領域から可視領域の光の吸収に基づく分光分析法を吸光光度法と呼び、物質の中には紫外・可視領域の光を吸収すると、そのエネルギーの一部を光として放出するものがある。この時に発する光には蛍光とりん蛍光があり、蛍光を利用する分析法が蛍光分析法 (fluorescence spectrometry) である[3]。一般に蛍光光度法は吸光光度法と比べ 2 桁以上高感度な分析法である。また、分析の用途に合わせ、抗体や核酸などのプローブに結合させた蛍光色素の開発が盛んに行われている。更に、蛍光色素を細胞に直接導入することで目的の分子を可視化でき蛍光色素を用いた蛍光光度法は多岐にわたっている[4-7]。

9.2. 分析法の開発

9.2.1. 実験

9.2.1.1. 装置と試薬

2.4.3.1.1. 装置と試薬に実験に用いた装置及び画像解析ソフトを記載した。Resorufin Sodium Salt (Sigma-Aldrich), ペルオキシダーゼ (Toyobo), Tris 塩酸塩, 過酸化水素, リン酸水素二ナトリウム, リン酸二水素カリウム, 塩酸, 水酸化ナトリウム (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。試薬は, 特級を使用し, 全て超純水を用いて調製した。対イオンには, 塩化ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム (Zephiramine[®]: Zeph⁺) (Tokyo Chemical Industry Co, Ltd.), 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries., Ltd.), ジドデシルジメチルアンモニウムブロマイド (DDAB) (Sigma Aldrich., Ltd) を使用した。吸着剤として, Wakogel[®] C-300 (形状: 全多孔性破碎型, 粒径: 45~75 μm), Wakogel[®] 50SAX (トリメチルアミノプロピル修飾シリカゲル: (SiO₂)-R₃NH₃⁺) (粒径: 40~63 μm), 陰イオン交換樹脂を使用した。各吸着剤は, 水で洗浄した後に室温で乾燥させたものを使用した。XAD-7HP 樹脂は, 乳鉢で粉碎した後, 沈降法で粒径を揃え室温で乾燥させたものを使用した。

9.2.1.2. 測定方法

レゾルフィンの捕集方法

1.5 mL マイクロチューブに試料 1 mL を添加し, 10 mg の吸着微粒子 (シリカゲル (SiO₂)), 1.0 mM の Zeph⁺を添加し, マイクロチューブを軽く振り混ぜ色素を SiO₂に捕集した。その後, 沈積した粒子の色調からレゾルフィンの濃度を求めた。スマートフォンで撮影し ImageJ で Red 値を測定した。

9.2.2. 結果と考察

9.2.2.1. 捕集の仕組みと吸着剤微粒子の種類

レゾルフィン を吸着する最適な吸着剤微粒子を選択した。10 μM のレゾルフィン 1 mL に微粒子 10 mg を添加して吸着させ、溶液の吸光度からレゾルフィンの捕集率を算出した。吸着時はレゾルフィン溶液の pH を 2~10 に調整し、吸光度の測定は pH 9.0 とした。レゾルフィンは多塩基酸であり蛍光 ($> \text{pH } 6$) を発するのは陰イオンの形態であるため、イオン交換を利用し正電荷をもつ吸着剤を使用した (Fig. 9.2.2.1.-1 (A))。また、目的成分とイオン対を生成する対イオンを 1 mM 添加し、レゾルフィンを吸着剤に吸着させた (Fig. 9.2.2.1.-1(B))。陰イオン交換体である $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$ を分散微粒子として用いた場合、捕集率は 20% 以下であった。陰イオン交換樹脂、イオン対抽出で SiO_2 に捕集したところ (対イオン; Zeph⁺: 1 mM, CTAB: 1 mM), pH の上昇に伴って捕集率が 90% まで上昇し、pH > 7.5 以上で安定に吸着した。しかし、陰イオン交換樹脂を LED 352 nm を照射して撮影したところ樹脂が白色の蛍光を示し、感度に影響した (Fig. 9.2.2.1.-2)。蛍光画像での測定には自家蛍光の無い吸着剤である SiO_2 が優れている。従って、 SiO_2 を固相としたイオン対抽出系がレゾルフィンの捕集に適していると考えた。

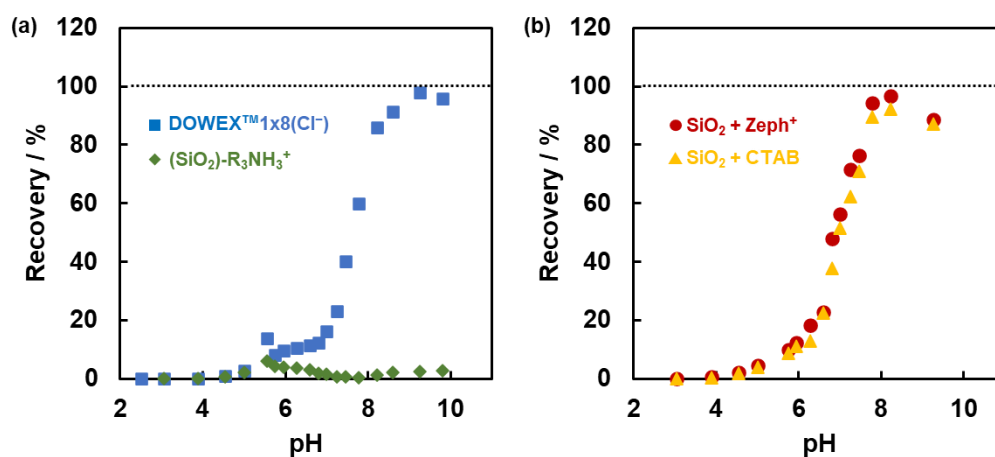


Fig. 9.2.2.1.-1 イオン交換とイオン対抽出による pH ごとの抽出率の比較

(a) 陰イオン交換樹脂による捕集率の比較, (b) イオン対抽出による捕集率の比較 (■ : DOWEX™ 1x8 (Cl⁻), ◆ : $(\text{SiO}_2)\text{-R}_3\text{NH}_3^+$, ● : $(\text{SiO}_2) + \text{Zeph}^+$, ▲ : $(\text{SiO}_2) + \text{CTAB}$)

9.2.2.2. 対イオンの種類と濃度

SiO₂を吸着剤として、7種類の対イオンを検討した。1.0 μMのレゾルフィン 1 mL (pH 8.2) に SiO₂ 10 mg と適宜濃度を変えた対イオンを添加した際の溶液の吸光度からレゾルフィンの捕集率を算出した (Table. 9.2.2.2.-1, Fig. 9.2.2.2.-1)。Fig. 9.2.2.2.-1 より、対イオンの濃度が高くなるに従って、SiO₂の捕集率は増加した。また、Table. 9.2.2.2.-1 より各対イオンを 1 mM 添加時の捕集率と臨界ミセル濃度 (CMC) を比較すると、CMC が低いほど SiO₂ へのレゾルフィンの捕集率が上昇する傾向が得られた。対イオンとして Zeph⁺が最も優れており 0.6 mM 以上で 90%以上の捕集率が得られた。そこで、対イオンに 1 mM の Zeph⁺を選択した。

Table. 9.2.2.2.-1 対イオンの種類と捕集率と CMC

対イオンの種類	Recovery / %	CMC / mM
1 CTAB	92.5	0.92
2 Zeph ⁺	95.1	0.37
3 塩化ベンゼトニウム	94.1	0.53
4 塩化ベンジルトリメチルアンモニウム	11.4	3.6
5 C ₈ TMA ⁺	-0.9	140
6 C ₁₀ TMA ⁺	13.3	65-70
7 C ₁₂ TMA ⁺	11.0	16

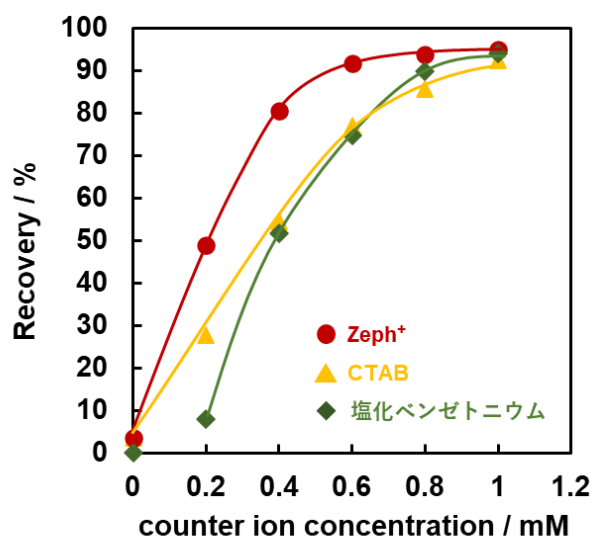


Fig. 9.2.2.2.-1 対イオン濃度によるレゾルフィンの捕集率の変動
(● : Zeph⁺, ▲ : CTAB, ◆ : 塩化ベンゼトニウム)

9.2.2.3. Zeph⁺の吸着量とレゾルフィンの捕集機構

Zeph⁺の SiO₂ の吸着量を測定し、レゾルフィンの捕集機構を解析した[8-10]。まず、Zeph⁺の濃度を適宜変えた溶液 (pH 8.2) 1 mL に SiO₂10 mg を添加して吸着させ、水相の吸光度 (263 nm) から Zeph⁺の SiO₂ への吸着量を算出した (Fig. 9.2.2.3.-1)。Zeph⁺濃度に応じたレゾルフィンの SiO₂ への捕集率と比較すると、Zeph⁺の吸着量の増加に伴ってレゾルフィンの捕集率が上昇した。ここで、Fig. 9.2.2.3.-1 で得られた Zeph⁺の SiO₂ への吸着量の曲線から平衡モデル (Eq. (9.2.2.3.-1)) を吸着定数 (K_{ads}) で表した (Eq. (9.2.2.3.-1))。

$$(SiO^-)_s + CS^+ \rightleftharpoons (SiO^- \times CS^+)_s \quad \text{Eq. (9.2.2.3.-1)}$$

$$K_{ads} = \frac{(SiO^- \times CS^+)_s}{\{(SiO^-)_s \times (CS^+)_{eq}\}} \quad \text{Eq. (9.2.2.3.-1)'}$$

Eq. (9.2.2.3.-1)' を Langmuir の式 (Eq. (9.2.2.3.-2)) を用いて展開し (Eq. (9.2.2.3.-3)), 吸着飽和度 ($\theta = W$ (吸着量) / W_s (飽和吸着量)) で示し Zeph⁺の SiO₂ への吸着シミュレーション式を得た Eq. (9.2.2.3.-4)。

$$\theta = W/W_s = KC_{eq}/(1 + KC_{eq}) \quad \text{Eq. (9.2.2.3.-2)}$$

$$(CS^+)_{eq} \times K_{ads} = \frac{(SiO^- \times CS^+)_s}{(SiO^-)_s} = \frac{\theta}{1 - \theta} \quad \text{Eq. (9.2.2.3.-3)}$$

$$\theta = (CS^+)_{eq} \times \frac{K_{ads}}{\{1 + (CS^+)_{eq} \times K_{ads}\}} \quad \text{Eq. (9.2.2.3.-4)}$$

Eq. (9.2.2.3.-4) を用いて 1 層目の吸着と 2 層目の吸着を合わせた式が Eq. (9.2.2.3.-5) となる。

$$\begin{aligned} \theta_{(1+2)} = & (CS^+)_{eq} \times K_1 / \{1 + (CS^+)_{eq} \times K_1\} \\ & + (CS^+)_{eq} \times K_2 / \{1 + (CS^+)_{eq} \times K_2\} \quad \text{Eq. (10.2.2.3.-5)} \end{aligned}$$

Eq. (10.2.2.3.-5) より Fig. 9.2.2.3.-1 を Langmuir 型の二層吸着モデルで解析した。Langmuir 解析値として $K_1 = 12$, $K_2 = 1.5$ としたシミュレーションの曲線と実験値を示した (Fig. 9.2.2.3.-2)。結果、SiO₂ への Zeph⁺の吸着は既存の研究と同様に 1 層目の吸着は 2 層目の吸着よりも定数が 10 倍程度大きくなること分かった。Fig. 9.2.2.3.-2 より、レゾ

ルフィンの捕集と Zeph⁺の捕集をまとめ捕集・吸着挙動が示す相互作用力の序列を考察した (Fig. 9.2.2.3.-3)。まず, Zeph⁺とレゾルフィンのイオン対の形成が起こり, 残存した Zeph⁺が SiO₂へ吸着し1層目を形成する。SiO₂への第1層目の形成と同時にイオン対 (レゾルフィン+ Zeph⁺) の吸着が起こると考えられる。Zeph⁺の SiO₂への2層目の形成は, 最後になる。この反応は Zeph⁺濃度の上昇とともに進むと考えられる。Zeph⁺共存下での SiO₂によるレゾルフィンの捕集機構は, ① SiO₂への Zeph⁺の吸着, ② Zeph⁺吸着相へのレゾルフィンの分配となる。そのため, 本系のように SiO₂表面に Zeph⁺の第1層目が形成し, その Zeph⁺層の形成過程でレゾルフィン (イオン対) が捕集されることから Zeph⁺は対イオンとしての働きの他に吸着剤としても作用している。

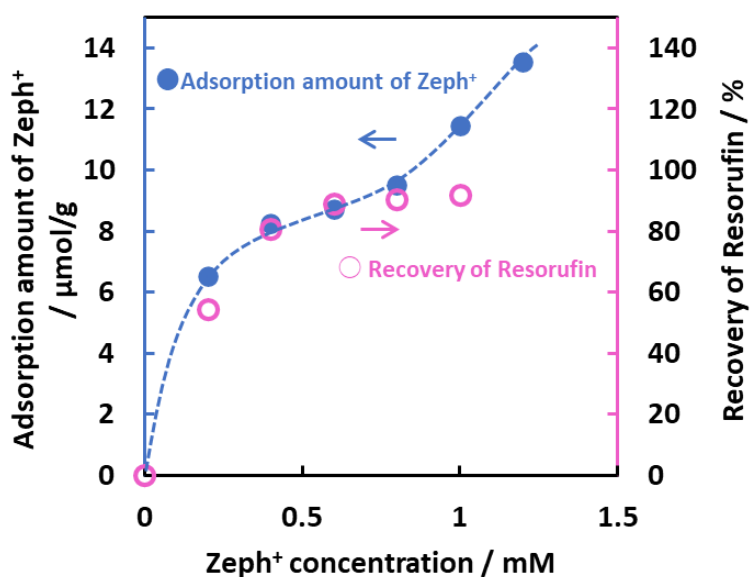


Fig. 9.2.2.3.-1 SiO₂への Zephiramine[®]の吸着量とレゾルフィン (イオン対) の捕集 (● 青点線: Zeph⁺の SiO₂の捕集量, ○: レゾルフィンの捕集率)

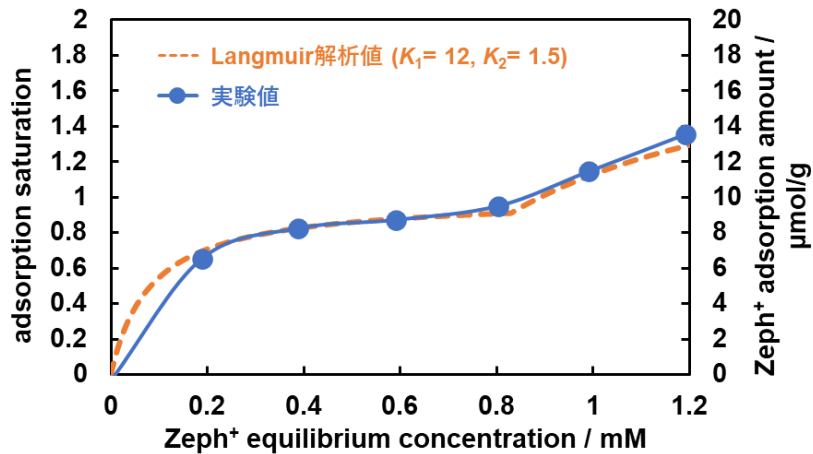


Fig. 9.2.2.3.-2 Langmuir の吸着曲線での SiO₂ への吸着量のシミュレーション (点線：Langmuir 解析値, 実線：実験値)

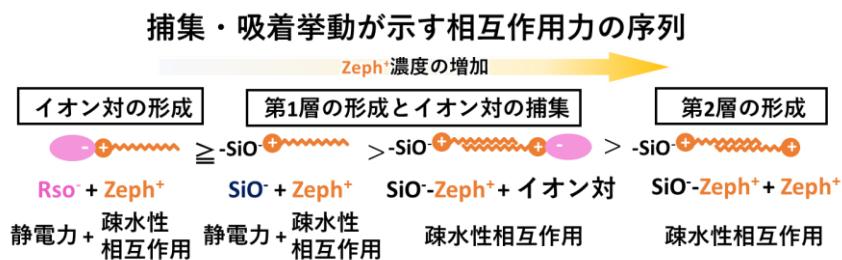


Fig. 9.2.2.3.-3 SiO₂ への捕集の序列の概略図

9.2.2.4. 画像測色法によるレゾルフィンの定量範囲

可視画像と蛍光画像でレゾルフィンの定量範囲を比較した。Fig. 9.2.2.4.-1 に、0~2.0 μM のレゾルフィンを吸着させ、撮影したマイクロチューブの写真を示した。微粒子を添加することで目視での判定は容易である。沈積した微粒子（固相）の Green 値の色調の強度を ImageJ のソフトウェアで測定し検量線を作成したところ 0.1~2.0 μM で $y = -32.9x + 154.2$, $R^2 = 0.98$ の直線が得られた。可視画像測色法の検出限界は、80 nM ($3\sigma_B$)であった。Fig. 9.2.2.4.-2 に LED : 352 nm を照射し撮影したマイクロチューブの写真を示した。可視光での判定が厳しい低濃度も判定ができる。可視画像と同様に沈積した微粒子（固相）の Red 値の色調の強度を ImageJ のソフトウェアで測定し検量線を作成したところ 0.01~0.2 μM で $y = 713.3x + 48.2$, $R^2 = 0.99$ の直線が得られた。そして、蛍光画像測色法の検出限界は、7 nM ($3\sigma_B$)と非常に高感度である。可視と蛍光の 2 つの検出方法を使うことで、測定範囲が広い簡易分析方法となった。

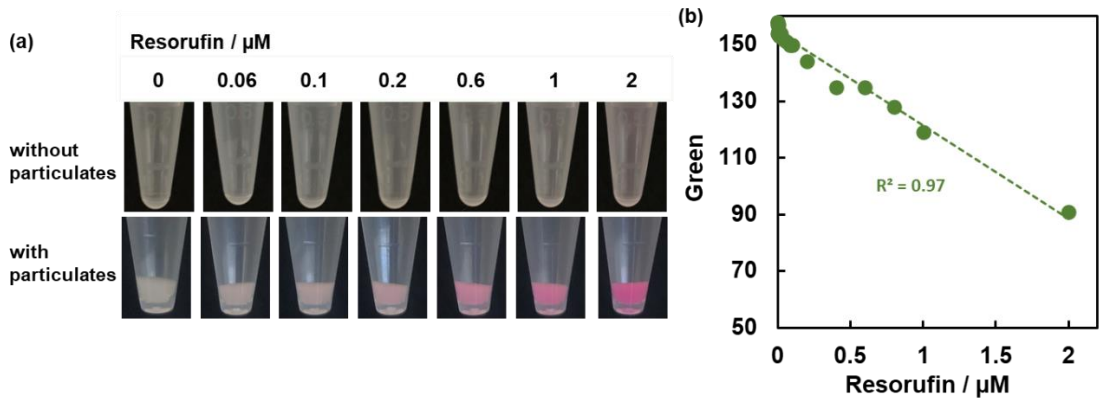


Fig. 9.2.2.4-1 可視光（白色光源）でのレゾルフィン濃度ごとの写真と画像解析で得られた検量線 (a) レゾルフィン濃度ごとのマイクロチューブの写真, (b) 沈積した微粒子の画像解析による検量線

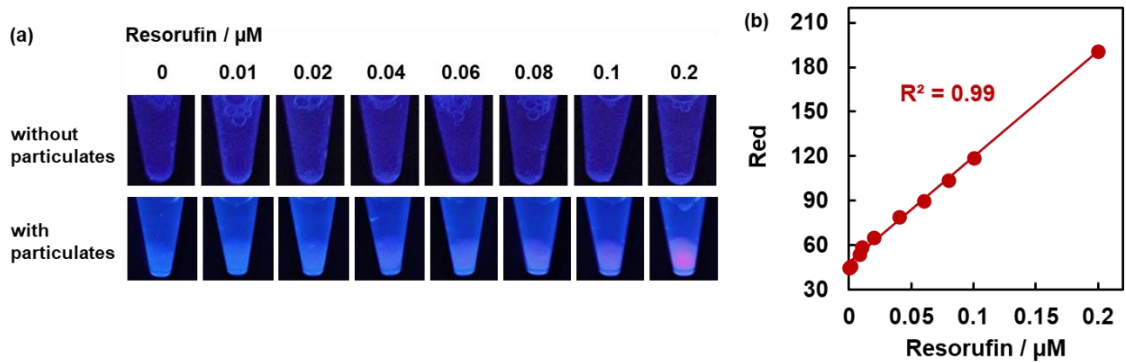
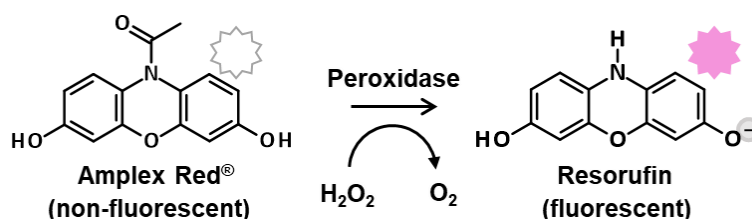


Fig. 9.2.2.4-2 蛍光（LED : 352 nm）でのレゾルフィン濃度ごとの蛍光写真と画像解析で得られた検量線 (a) レゾルフィン濃度ごとのマイクロチューブの蛍光写真, (b) 沈積した微粒子の画像解析による検量線

9.2.2.5. 酵素法を用いた過酸化水素の測定への応用

環境水中の過酸化水素 (H_2O_2) は季節変動や日射量で濃度が推移することが報告されている [11-16]。また、雨水中に含まれる H_2O_2 が河川水や海域に流入することでサンゴ礁や水生生物の生育に影響を与える可能性があることから、環境水中の H_2O_2 濃度のモニタリングが必要である。 H_2O_2 は直ちに分解するためその場での迅速な測定が必要である。そこで、レゾルフィンの前駆体である Amplex Red[®] と酵素法を用いて H_2O_2 の測定をした (Scheme 9.2.2.5-1) [17-20]。

Amplex Red[®] は呈色が安定するまでに時間を要する。そこで最適な呈色時間を検討した。50 μM の Amplex Red[®] に 0.26 mU/mL のペルオキシダーゼと 10 μM の H_2O_2 を反応させ経時変化をみたところ 10 分間 (26 $^\circ\text{C}$) で安定した (Fig. 9.2.2.5.-1)。この条件をもとに H_2O_2 の検量線を作成した。Fig. 9.2.2.5.-2 に、0-1.0 μM の H_2O_2 で反応させ、撮影したマイクロチューブの写真を示した。Fig. 9.2.2.5.-2 より、微粒子 (固相) の Red 値の色調の強度を ImageJ のソフトウェアで測定し検量線を作成したところ 0.01-0.2 μM で $y = 49.7x + 65.3$, $R^2 = 0.96$ の直線が得られた。検出限界は 0.28 μM ($3\sigma_B$) であった。これは環境中の H_2O_2 の濃度を十分に測定可能である。実試料として河川水と雨水に応用した (Table. 9.2.2.5.-1)。蛍光画像を用いる sub μM レベルの H_2O_2 の簡易分析法を開発できた。



Scheme 9.2.2.5-1 Amplex Red[®] の H_2O_2 測定時の呈色反応

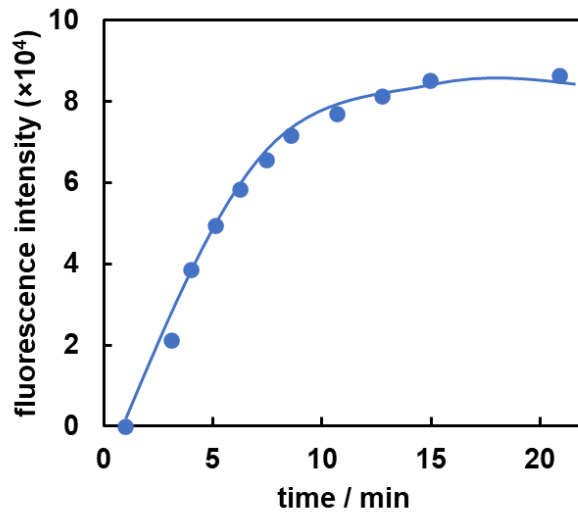


Fig. 9.2.2.5.-1 H₂O₂測定時の溶液の呈色反応の経時変化

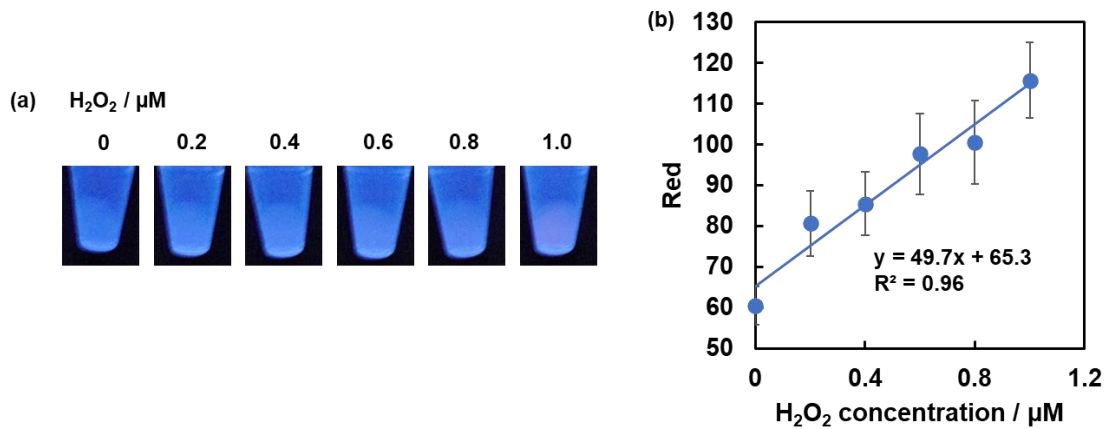


Fig. 9.2.2.5.-2 H₂O₂濃度ごとの蛍光写真と画像解析で得られた検量線

(a) H₂O₂濃度ごとのマイクロチューブの蛍光写真, (b) 沈積した微粒子の画像解析による検量線

Table. 9.2.2.5.-1 環境水中のH₂O₂の測定

sample	Measured value / μM
river water	0.76 ± 0.05
rainwater 1	0.95 ± 0.03
rainwater 2	2.39 ± 0.014

n=3

9.3. まとめ

レゾルフィン を 1.0 mM の Zeph⁺ でイオン対とし、SiO₂ に捕集し、蛍光画像測色法に応用した。SiO₂ へのレゾルフィンの捕集機構を Zeph⁺ の吸着量から解析した。Zeph⁺ の SiO₂ への捕集は Langmuir 型の吸着で解析できた。結果、Zeph⁺ とレゾルフィンのイオン対の SiO₂ への捕集は Zeph⁺ の SiO₂ への捕集に応じて変化した。本法はカメラで撮影した蛍光画像から高感度な測定を可能とした。可視画像の場合、0.1~2.0 μM の範囲で直線的に測定でき、検出限界は 80 nM (3σ_B) であった。蛍光画像の場合、0.01~0.2 μM の範囲で直線的に測定でき、検出限界は 7 nM であった。そのため、画像撮影時に照射するライトを変えることで低濃度 (蛍光) から高濃度 (可視光) と目的成分濃度に応じて測定範囲を変えることができる。また、Amplex Red[®] とペルオキシダーゼを用いた H₂O₂ の測定法に応用したところ、0~1.0 μM を測定でき、検出限界が 0.28 μM (3σ_B) であった。河川水と雨水でも測定でき、蛍光画像を用いた sub μM レベルの H₂O₂ の簡易分析法を開発できた。今後は、環境や生体試料測定法の感度上昇や、蛍光画像で班的できるため現場測定への幅広い応用が可能である。

9.4. 参考文献

- [1] D. Ibáñez, D. I. Bote, A. P. Junquera, M. Begona G. García, D. H. Santos, P. F. Bolado, *Dyes and Pigments*, (2020), 172, 107848. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107848>
- [2] E. R. Vehniäinen, E. Schultz, H. Lehtivuori, J. A. Ihalainen, A. O.J. Oikari, *Aquatic Toxicology*, (2012), 116–117, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.007>
- [3] 大谷 弘之, 電気化学および工業物理化学, (1991), 59, 22-27. <https://doi.org/10.5796/kogyobutsurikagaku.59.22>
- [4] B. T. Huy, D. T. Thangadurai, M. Sharipov, N. N. Nghia, N. V. Cuong, Y. I. Lee, *Microchemical Journal*, (2022), 179, 107511. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107511>
- [5] H. Zhang, S. Yang, K. D. Ruyck, N. V. Beloglazova, S. A. Eremin, S. D. Saeger, S. Zhang, J. Shen, Z. Wang, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2019), 114, 293-313. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.013>
- [6] F. Zhang, L. Xu, Q. Zhao, Y. Sun, X. Wang, P. Ma, D. Song, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2018), 256, 1069-1077. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.055>
- [7] M. Kagawa, K. Morioka, M. Osashima, A. Hemmi, S. Yamamoto, A. Shoji, K. Uchiyama, H. Nakajima, *Talanta*, (2023), 256, 124311. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124311>
- [8] 石黒 宗秀, 土壌の物理性, (2018), 140, 23-28. https://doi.org/10.34467/jsoilphysics.140.0_23
- [9] 石黒 宗秀, 土壌の物理性, (2019), 141, 85-90. https://doi.org/10.34467/jsoilphysics.141.0_85

- [10] 石黒宗秀, 土壌の物理性, (2021), 147, 35-42. https://doi.org/10.34467/jssoilphysics.147.0_35
- [11] 黄松南, 布施泰朗, 山田悦, 分析化学, (2004), 53, 875-881. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.53.875>
- [12] T. Arakaki, H. Fujimura, A. M. Hamdun, K. Okada, H. Kondo, T. Oomori, A. Tanahara, H. Taira, *Journal of Oceanography*, (2005), 61, 561-568. <https://doi.org/10.1007/s10872-005-0064-9>
- [13] T. Higuchi, H. Fujimura, T. Arakaki, T. Oomori, *Galaxea fascicularis Marine Biology*, (2009), 156, 589-596. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-1110-0>
- [14] R. Zika, E. Saltzman, W. L. Chameides, D. D. Davis, *J. Geophys. Res.*, (1982), 87, 5015-5017. <https://doi.org/10.1029/JC087iC07p05015>
- [15] G. B. Avery, W. J. Cooper, R. J. Kieber, J. D. Willey, *Marine Chemistry*, (2005), 97, 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2005.03.006>
- [16] 優先評価化学物質のリスク評価(一次)過酸化水素, 厚生労働省, <https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000806532.pdf> (Accesses March 1, 2023)
- [17] P. E. Brandish, C. S. Chiu, J. Schneeweis, N. J. Brandon, C. L. Leech, O. Kornienko, E. M. Scolnick, B. Strulovici, W. Zheng, *SLAS Discovery*, (2006), 11, 481-487. <https://doi.org/10.1177/1087057106288181>
- [18] J. G. Mohanty, J. S. Jaffe, E. S. Schulman, D. G. Raible, *J. Immunol. Methods*, (1997), 202, 133-141. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(96\)00244-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(96)00244-X)
- [19] J. V. Rodrigues, C. M. Gomes, *Free Radic. Biol. Med.*, (2010), 49, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.014>
- [20] Y. Zhang, C. Pilapong, Y. Guo, Z. Ling, O. Cespedes, P. Quirke, D. Zhou, *Anal. Chem.*, (2013), 85, 9238-9244. <https://doi.org/10.1021/ac402081u>

第 10 章 総括

本研究では、水中に分散し、自然沈降する微粒子を用いて、呈色反応と吸着反応（分離・濃縮）を同時進行することで分析操作の簡便化・迅速化を達成した。更に、分散微粒子抽出法と画像測色技術を融合させることで新しい簡易比色分析システムを構築した。

開発した方法の操作概略

本法の測定操作は非常に簡便・迅速である。呈色試薬（粉末）と微粒子を入れた容器に試料水（1 mL）を採り、軽く振った後、静置するだけで濃縮を伴う分析操作が完結する。沈積した微粒子の色調を目視や画像解析で判定し、目的成分の濃度を求める。長くとも 20 秒以内、短いものでは 30 秒以内で測定できるので、現場分析に適している。

固相抽出系の設計と知見

本研究では、目的成分の呈色反応はそれぞれ既存法の中から汎用性の高いものを選択した。この研究では呈色成分の捕集が非常に重要である。呈色成分の化学特性に応じた抽出系を設計し、微粒子の素材を選択した。以下に用いた主な抽出系と開発中に見出された知見を述べる。

(1) **イオン交換による捕集**： Fe^{2+} は $[\text{Fe}(\text{o-phen})_3]^{2+}$ 錯体としてシリカゲル、 NH_4^+ は(色素)⁻として陰イオン交換樹脂で捕集した。この捕集形態を単成分の捕集モデルとした。微粒子で目的呈色成分を捕集することにより、溶液の目視分析と比較して Fe^{2+} は 10 倍、 NH_4^+ は 5 倍の高感度化を達成した。それぞれ河川水の分析に応用し、機器分析法と同等の結果が得られた。HCHO の分析では呈色目的成分（青色）と過剰の試薬（黄色）、いずれも陽イオンを同時吸着させたところ、微粒子の素材によって目的成分の濃度に応じた色調の変化が大きく異なった。この違いは両成分の吸着定数（Henry の式より算出）の差によって説明できることを明らかにした。 NO_2^- の分析では、(アゾ色素)⁺に変換し、プロピルスルホン酸修飾シリカゲルで捕集した。その際、微粒子の着色速度が溶液中での呈色速度よりも約 2 倍速く、測定時間が短縮できることを発見した。これは微粒子が単なる分離・濃縮場ではなく呈色反応場としても有効に機能したためである。この着色促進効果は、 CN^- の定量時でも同様にみられた。 Mn^{2+} は MnO_4^- として陰イオン交換体に捕集した。開発した MnO_4^- の捕集法を COD の測定法へ応用することに成功し、淡水、汽水、海水の COD の現場測定法の開発を達成した。

(2) **複合的な相互作用による捕集**： Ni^{2+} の PAR 錯体は pH によって電荷が変化する。陰イオンを捕集する機能と中性成分を捕集する機能を合わせ持つ微粒子を作製して良好な結果を得た。 PO_4^{3-} は酵素法を用いて双性イオンに変換して、XAD-7HP（親水性の無電荷粒子）へ捕集できた。微粒子の粒径や添加量が吸着定数や粒子の沈降速度に与える影響を調べたところ、測定範囲や感度を幅広く調節可能であることを示すことができた。

(3) **イオン対の生成を利用する捕集**： $\text{Cr}(\text{VI})$ のジフェニルカルバジド錯陽イオンは、対イオンとしてドデシル硫酸ナトリウムを添加し、イオン対に変換し、XAD-7HP によって捕

集できた。イオン対抽出平衡モデルから対イオンを選択し、さらに捕集成分の化学形の推定をしたところ、XAD-7HP への抽出化学種は $\text{Cr(DPC)}_3 \cdot \text{H}^+ \cdot \text{DS}^-$ であることがわかった。本法は、溶媒抽出の吸着理論で微粒子へのイオン対抽出の機構を説明できることから、各定数から微粒子への捕集条件を推定することに役立てることが可能である。また、 H_2O_2 の蛍光分析に用いたレゾルフィン（蛍光体：陰イオン）の捕集では、 Zeph^+ を対イオンとするイオン対抽出系を設計し、シリカゲルで捕集した。本法は Zeph^+ とイオン対を形成したレゾルフィンが、シリカゲル表面に形成した Zeph^+ 層に抽出される静電相互作用と疎水性相互作用が発現する特異な捕集系であることを解明した。これは、CN の捕集形態も同様に説明することができるモデルである。イオン対抽出を用いた捕集では、選択した対イオンによる呈色目的成分の捕集率の向上の他に、試薬の溶解促進や呈色目的成分の色調の変化などに寄与することが見出された。これらを解明することで本法の性能の向上につながると思われる。

オンサイト分析のためのデバイスの設計と画像解析による高感度化と環境水への応用

微粒子層をスマートフォン等で撮影し、その画像の色情報を解析する画像解析技術を取り入れることで、目視法よりも客観的で、より高感度で再現性のよいデータを得ることができる。本法を、環境水（河川水、地下水、雨水、海水、ため池）に適用したところ測定結果は機器分析法等とよく一致した。また、採水から測定までを片手で操作でき、目的成分の呈色反応に必要な反応段階に応じた反応場を増設できるデバイスを開発することによって、その場での簡便な測定を可能とした。さらに、本法に適した測定時の照射光と検出の角度を変えて撮影した画像を用いた測色法で、試料中の有色成分の影響を低減できた。

以上のように 9 つの測定対象物質の簡易分析法の開発から得られた知見を学位論文として記述した。開発した方法では、目視では水相の比色測定よりも 2~10 倍高感度化が達成され、画像処理を導入することによってさらに高感度で信頼性の高い結果が得られ、着色成分の影響も低減することができた。本法には、微粒子の素材、粒径、添加量等によって測定範囲を広く調節できる特長がある。微粒子による呈色速度の促進効果は分析操作の短縮に繋がる成果である。これまで主に採水現場での簡易分析システムを展開してきたが、このシステムの原理は室内分析を含めた広い環境以外の医療、食品など種々の分野での更なる発展が期待できる。また、画像測色法による分析データの数値化は、現場でリアルタイムに多点的に質の高い測定値を収集することができることから、現場分析の全自動化への発展に貢献できると考えている。

謝辞

はじめに、本研究の遂行と学位論文の執筆にあたり、終始熱心なご指導を頂いた、環境化学計測 I 講座の倉光英樹 先生、田口 茂 先生に深く感謝致しますとともに、厚く御礼申し上げます。

多大なご指導、ご助言を頂きました環境化学計測 I 講座の佐澤和人 先生、波多宣子 先生、明治大学 理工学部 岡崎琢也 先生に心より感謝申し上げます。

富山大学学術研究部 張 勁 先生、加賀谷重浩 先生、和田直也 先生、には、本学位論文をまとめるにあたり、ご懇切なご指導、ご助言を賜りました。心より御礼申し上げます。

第 3 章では、富山大学理学部環境化学計測 I 講座の松平光暉 氏、第 7 章では、富山大学理学部環境化学計測 I 講座の川畑美佳 氏に多大なる協力を仰ぎながら研究を進めることができました。心より感謝申し上げます。

本論文は同研究室の学生、卒業生に支えられ作成に至りました。厚く御礼申し上げます。最後に、学生生活を送るにあたり支えて下さった家族、友人に深く感謝いたします。

2023 年 3 月

小濱 望

研究業績資料

関連論文

1. Nozomi Kohama, Koki Matsuhira, Takuya Okazaki, Kazuto Sazawa, Noriko Hata, Hideki Kuramitz, Shigeru Taguchi, “Colorimetric analysis based on solid-phase extraction with sedimentable dispersed particulates: demonstration of concept and application for on-site environmental water analysis”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414, 8389–8400 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04375-y>
2. Nozomi Kohama, Takuya Okazaki, Kazuto Sazawa, Noriko Hata, Hideki Kuramitz, Shigeru Taguchi, “Simple Solid-phase Colorimetry for Trace Cr(VI) by Combination of Complexation with Diphenylcarbazide and Ion-pair Solid-phase Extraction with Sedimentable Dispersed Particulates ” , *Analytical Sciences*, (2023). <https://doi.org/10.1007/s44211-023-00286-9>

参考論文

1. 小濱望・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂, 「分散した微粒子への吸着を利用する感度や選択性に優れた簡便な比色分析法」ケミカルエンジニアリング, 化学工業社, 65 巻, 593-600 頁, 2020.

国際学会発表

1. Nozomi Kohama, Takuya Okazaki, Kazuto Sazawa, Noriko Hata, Hideki Kuramitz, Shigeru Taguchi, “A novel methodology for simple analysis based on colorimetry using sedimentable dispersed particulates”, *RSC Tokyo International Conference 2022*, 2022. 12. 5-6

国内学会発表

1. ○松平光樹・小濱望・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大院理工) 「微粒子への吸着を利用した亜硝酸の高感度な簡易分析法」平成 30 年度日本化学会北陸地区講演会と研究発表会, 2018 年 11 月 30 日, 富山大学. (ポスター)
2. ○坂本尚輝・小濱望・田口茂・倉光英樹・佐澤和人・波多宣子 (富山大院理工) 「有機イオン会合体の自発的相分離を利用したホルムアルデヒド濃縮定量法の開発と雨水への応用」平成 30 年度日本化学会北陸地区講演会と研究発表会, 2018 年 11 月 30 日, 富山大学. (ポスター)
3. ○小濱望・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂・岡崎琢也 (富山大学院理工・明治大理工) 「分散微粒子抽出法 (1) –原理と鉄(II)及びホルムアルデヒドの簡易分析への応用–」K3001 日本分析化学会 第 67 年会, 2018 年 9 月 12 日~14 日, 東北大学. (口

頭) 展望とトピックスに選出

4. ○小濱望・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「分散微粒子抽出法 (2) — ホルムアルデヒドの比色分析における呈色試薬と目的成分の微粒子への吸着挙動と色調変化 —」 Y1052 日本分析化学会 第 79 討論会, 2019 年 5 月 18 日~19 日, 北九州国際会議場. (ポスター)
5. ○小濱望・松平光樹・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「分散微粒子抽出法 (3) — 亜硝酸の簡便で高感度な比色分析法の開発 —」 H1002 日本分析化学会 第 79 討論会, 2019 年 5 月 18 日~19 日, 北九州国際会議場. (口頭)
6. ○小濱望・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「分散微粒子抽出法 (4) — 酵素法を用いたリン酸の高感度な簡易比色分析法の開発 —」 Y2032 日本分析化学会 第 68 年会, 2019 年 9 月 11 日~13 日, 千葉大学西千葉キャンパス. (ポスター)
7. ○波多宣子・坂本尚輝・小濱望・佐澤和人・田口茂・倉光英樹 (富山大学院理工) 「自発的に水相から分離する有機イオン会合体相への抽出を利用する雨水中のホルムアルデヒドの濃縮/吸光度定量」 P3023 日本分析化学会 第 68 年会, 2019 年 9 月 11 日~13 日, 千葉大学西千葉キャンパス. (ポスター)
8. ○小濱望・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「分散微粒子による吸着を用いた高感度な簡易分析法の開発と環境水への応用」 P-47 第 38 回分析化学中部夏期セミナー, 2019 年 9 月 2 日, 3 日, インテック大山研修センター. (ポスター) 優秀ポスター発表賞受賞
9. ○川畑美佳・小濱望・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「ワンステップで呈色濃縮測定する高感度なマンガンの目視分析法の開発」 P-48 第 38 回分析化学中部夏期セミナー, 2019 年 9 月 2 日, 3 日, インテック大山研修センター. (ポスター)
10. ○小濱望・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「分散微粒子抽出法 (6) — ジフェニルカルバジド呈色法とイオン対固相抽出を利用する Cr(VI)の高感度な簡易比色分析法の開発 —」 Y1050 日本分析化学会 第 81 討論会, 2021 年 5 月 22 日~23 日, オンライン開催. (ポスター)
11. ○川畑美佳・小濱望・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「分散微粒子抽出法 (5) — 過マンガン酸イオンの微粒子への吸着を利用するオンサイト COD 測定法の開発 —」 B1001 日本分析化学会 第 81 討論会, 2021 年 5 月 22 日~23 日, オンライン開催. (口頭)
12. ○小濱望・川畑美佳・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「分散微粒子抽出法 (7) — オンサイト分析のためのモバイル型撮影ボックスの開発と画像測色法によるシアンの高感度分析 —」 F2003 日本分析化学会 第

70 年会, 2021 年 9 月 22 日~24 日, オンライン開催. (口頭)

13. ○川畑美佳・小濱望・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「分散微粒子抽出法 (8) - 海水に適応可能なオンサイト COD 画像測色法の開発 -」 Y3022 日本分析化学会 第 70 年会, 2021 年 9 月 22 日~24 日, オンライン開催. (ポスター) 優秀ポスター発表賞受賞
14. ○川畑美佳・小濱望・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「過マンガン酸イオンの微粒子への吸着を利用する COD のオンサイト画像測色法 - 淡水, 汽水, 海水への応用 -」 3-E-10-2 第 56 回日本水環境学会年会, 2022 年 3 月 16 日~18 日, オンライン開催. (口頭)
15. ○小濱望・岡崎琢也・佐澤和人・波多宣子・倉光英樹・田口茂 (富山大学院理工・明治大理工) 「分散微粒子抽出法 (9) - レゾルフィンの微粒子への吸着挙動と蛍光画像測色法 -」 YB1171 日本分析化学会 第 71 年会, 2022 年 9 月 14 日~16 日. (ポスター) 優秀ポスター発表賞受賞