

機関番号：13904

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20560504

研究課題名（和文）

環境水中リン酸イオンの簡易な超高感度分析法の開発

研究課題名（英文） Development of simple detection methods for ultra-trace phosphate in water

研究代表者

木曾 祥秋 (KISO YOSHIAKI)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20144206

研究成果の概要（和文）：本研究では、水中の極微量レベルのリン酸を測定する方法として、HPLC と組み合わせたオンライン固相抽出法の開発を行った。通常の高感度測定法より検出感度は著しく改善された(0.1 $\mu\text{g PO}_4/\text{L}$)。本法では、モリブデンブルーと四級アンモニウムイオンのイオン会合体を DOS ミニカラムで捕捉・濃縮し、 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ の移動相で溶出させて uv/vis 検出器で定量を行った。本法は、測定範囲が広く(0.1–200 $\mu\text{g PO}_4/\text{L}$)、かつ塩分の影響を受けないことが特長である。

研究成果の概要（英文）：We developed a method for measuring ultra-trace level phosphate by online solid-phase extraction combined with HPLC. The detection limit (0.1 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$) was successfully improved with comparison to a conventional sensitive analytical method. In this method, ion pair of phosphoantimonymolybdenum blue and a quaternary ammonium ion was entrapped with a ODS mini-column, and the ion pair was eluted with $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ to quantified it by uv/vis detector. The advantages of this method are a wide detecting range (0.1–200 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$) and no disturbance with salinity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：富栄養化、リン酸イオン、超高感度分析、オンライン固相抽出、検出限界、ダイナミックレンジ

1. 研究開始当初の背景

閉鎖性水域における富栄養化の主たる因子はリンであり、排水処理における窒素・リン除去が重要な課題であることが広く認識されている。除去技術としては、凝集法が最も一般的であるが、汚泥の生成と資源としてのリンの回収が困難であることから、申請者らは

無機イオン交換体であるヒドロタルサイト（HTAL）によるリン除去特性およびリン回収を含むリン除去システムの開発を進め、その過程で簡易で精度の高いリン分析法の開発を必要とした。

一方、通常の間定分析法におけるリンの検出限界以下であっても、藻類の増殖が認めら

れており、自然水中のリンの挙動を解明するためには高感度のリン分析法が必要とされている。一般的に用いられている高感度リン分析法は、フローインジェクション分析法(FIA)であり、その検出限界は1~2 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ である。しかしながら、FIAによる自動分析装置は高価であり、その測定には制約が大きい。また、上記検出限界が必ずしも満足できるレベルでないことも指摘できる。

水質が徐々に悪化しつつある琵琶湖における表層水のリン酸イオン濃度の測定値をみると、北湖においては年間ほとんど1 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ 未満であり、南湖においても夏季に1 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ 未満となることが報告されている。このような状況において、水域生態系でのリンの挙動を解明するためには、超高感度リン測定法が必要といえる。

既に、リン酸イオンの超高感度分析の開発研究は進められている。Yaqoobら、Liら、Zhangらは、検出限界値が0.1 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ レベルの測定法を提案している。しかしながら、これら測定法はFIA法に基づくものであり、測定装置は特別に作製したものを使用している。また、多くの高感度分析法に見られるように、ダイナミックレンジは0.1~2 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ と狭いことが課題である。

2. 研究の目的

本研究では、3価の陰イオンであるモリブデンブルーが炭素鎖の大きい有機カチオンと容易にイオン会合体を形成する特性に着目し、このイオン会合体を抽出・濃縮する方法によって検出感度を向上させることを目的とした。目標とする検出感度によって以下の2つの方法の開発を行った。

(1)高感度分析法(メンブレン抽出法)

モリブデンブルーと四級アンモニウム塩のイオン会合体を形成させた後、その溶液をメンブレンフィルターでろ過することにより、このイオン会合体をメンブレンフィルター上に捕集する。捕集したイオン会合体を適切な有機溶媒を用いて抽出するし、分光光度計で測定する方法を開発する。試料の濃縮倍率を適切に設定し、自動分析装置と同程度の検出限界(1 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$)を達成することを目標とした。

(2)超高感度分析法(オンライン固相抽出-HPLC法)

超高感度測定を達成するためには、イオン会合体をより高い濃縮倍率で抽出するか検出器感度の改善のいずれかによらなければならない。前者の方法には限界があるが、高感度の紫外・可視検出器としては高速液体クロマトグラフ(HPLC)で使用されている紫外・可視吸光検出器の利用が可能である。また、

抽出方法として固相抽出法を用いると、HPLCとの連結が可能となり、オンライン固相抽出-HPLCシステムを構築することができる。その結果、イオン会合体濃度をクロマトグラム面積として定量可能となる、モリブデンブルーと四級アンモニウムイオンとの疎水性イオン会合体を本システムに導入し、0.1 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ レベルの検出感度を達成することを目標とし、測定条件の最適化を行った。

3. 研究の方法

(1)モリブデンブルーの形成

U.S. Standard Methodにしたがって、モリブデン酸アンモニウム、酒石酸アンチモニルカリウム、硫酸、アスコルビン酸からなる反応溶液を調製した。

(2)イオン会合体の形成

モリブデンブルーとイオン会合体を形成させる四級アンモニウム塩として、benzylcetyl-diethylammonium bromide (BCDMA)、hexadecyltrimethylammonium bromide (HTMA)、dodecyltrimethylammonium bromide (DTMA)を用いた。これら四級アンモニウム塩の0.1%メタノール溶液を調製した。

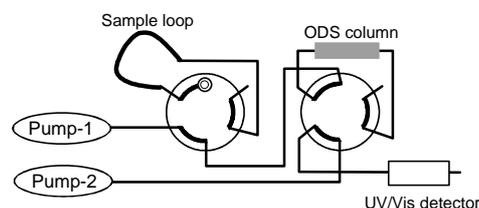
モリブデンブルー溶液に対する上記溶液の添加量、攪拌または超音波照射による反応促進、反応温度の影響について検討し、至適条件を明らかにした。

(3)メンブレン抽出法

リン酸イオン標準溶液50mLあるいは100mLを用いて、モリブデンブルーを呈色させ、上記(2)で得られた至適条件下でイオン会合体を形成させた。この溶液を親水性PTFE膜(細孔径:0.1 μm)によって全量ろ過した。さらに少量の水をろ過して膜表面を洗浄した。イオン会合体を捕捉した膜をメタノール、エタノール、アセトニトリル、4-メチル-2-ペンタノン各5mL(標準溶液が100mLの場合は、10mL)に浸漬し、5分間超音波抽出を行った。その後、抽出液を親水性PTFE膜(0.2 μm)でろ過し、吸光度測定に供した。

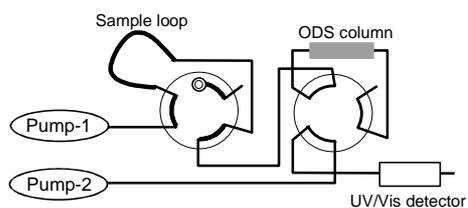
(4)オンライン固相抽出システム

システムは、2台の送液ポンプ、サンプルインジェクター、6方バルブ、ODSカラム、uv/vis検出器から構成した。本システムを、試料の導入、ODSカラムによる吸着とカラムの洗浄、目的物質の脱着と定量の3つの段階に対応させて、図1に示すようにバルブの操作を行った。

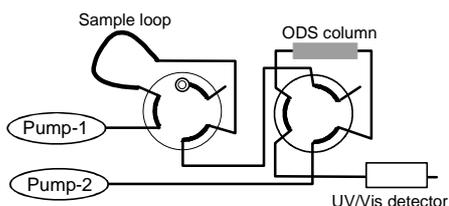


(試料の導入)

図 1 (1) オンライン固相抽出システム



(ODS カラムへの吸着)



(ODS カラムからの脱着と定量)

図 1 (2) オンライン固相抽出システム

(5) 試料供給量と ODS カラムのサイズ

測定感度の向上には、モリブデンブルー溶液の供給量を増加させ、それに対応した ODS カラムのサイズの検討を行った。その結果、溶液 5mL を供給した場合、10mm のカラムでは不十分であり、50mm のカラムが必要であった。以降は、このカラムを用いて試料供給量 5mL とした。

(6) オンライン固相抽出条件

オンライン固相抽出を効率的に行うためには、試料溶液の供給速度、残留共存物質除去のための洗浄液量、脱着溶媒の組成と流速、流量、ODS カラムのコンディショニングについて、検討を行った。

(6) 共存物質の影響

本法はモリブデンブルー法を基本としていることから、淡水系の試料でシリカの影響が、また、海水系の試料については塩分の影響が考えられる。シリカの影響については、モリブデンブルー法の呈色反応試薬の硫酸濃度の影響を検討した。塩分の影響としては、NaCl 濃度を 3.5% までの範囲で変化させて影響を検討した。

(7) 環境水の測定

環境水については、リン酸イオン濃度が低いことが想定される水域を対象とすることが望ましい。そのため、豊川（愛知県）上流部の鳳来湖において採水し、本法および FIA による自動分析装置を用いてリン酸イオン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) イオン会合体の形成条件

イオン会合体形成試薬としての四級アンモニウム塩としては、メンブレン抽出または固相抽出のいずれにおいてもリガンドに高い疎水基を有することが望ましい。しかしながら、未反応の四級アンモニウム塩が測定を妨害する可能性があるため、未反応の四級アンモニウム塩を比較的容易に除去できることが望ましく、そのためにはリガンドの疎水性は低い方が望ましい。検討した結果、メンブレン抽出法に対しては HTMA が適切で、固相抽出法に対しては DTMA が適切であった。

標準溶液 50mL に対する 0.1% HTMA-MeOH 溶液の添加量を検討した。添加量が多くなると、図 2 に示すようにブランクの吸光度が増加し、測定誤差が増加する傾向が認められた。至適添加量は、1.0mL と判断された。

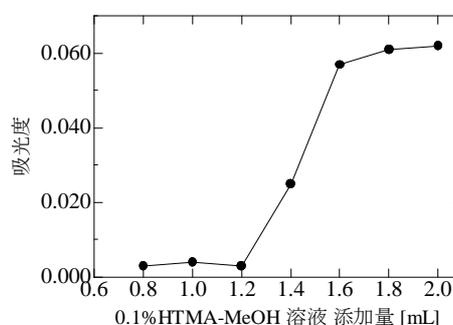


図 2 HTMA-MeO 溶液の添加量とブランクの吸光度

イオン会合体形成反応条件として、室温で振とうあるいは攪拌、室温または氷冷条件下での超音波照射について検討を行い、メンブレン抽出法によってイオン会合体の形成特性を評価した。その結果、氷冷条件下での超音波照射が最も効率的で、15~20 分の反応時間で安定した結果が得られることが示された。

オンライン固相抽出法においては、標準溶液 50mL に対する 0.1% DTMA-MeOH 溶液の添加量を検討した。なお、イオン会合体形成反応条件は、氷冷条件下での超音波照射とした。その結果、0.5~2.5mL の添加量において吸光度に影響を及ぼさなかった。そのため、DTMA 溶液添加量は 1.5mL とした。

(2) メンブレン抽出法による定量性

上記方法で形成させたイオン会合体を親水性 PTFE 膜(細孔径: 0.1 μ m)によって全量ろ過し、膜に捕捉されたイオン会合体を有機溶媒で抽出した。溶媒としては、水の溶解性があり、抽出効率が高いことから、アセトニトリルが最も適切であった。

メンブレン抽出法では、モリブデンブルーが10倍濃縮されることになる。さらに抽出液の吸光度は、イオン会合体あるいは溶媒によって最大吸収波長のシフトと最大吸光度の変化の影響を受ける。アセトニトリル抽出液の最大吸収波長は690nmであった。

本法において、リン酸イオン濃度が200 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ 以下において高い直線性が得られた。なお、200 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ は、公定法による分光高度法で測定可能である。低濃度領域における検量線の例を図3に示す。なお、濃縮倍率を10倍あるいは20倍とし、分光光度計の測定には50mmセルを用いた。10倍濃縮の場合の方が吸光度は低い、安定性が高かった。5回の繰り返し測定における相対標準偏差は、1 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ および0.5 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ において、それぞれ8.2%、14.0%であった。

これらの結果から、メンブレン抽出法は、FIAのような特別な装置を用いることなく、FIAと同程度あるいは若干高感度にリン酸イオンの測定が可能であることが示された。

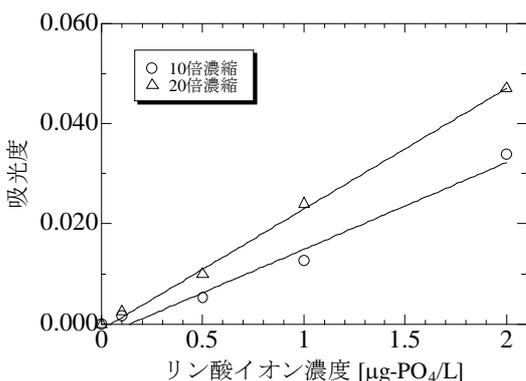
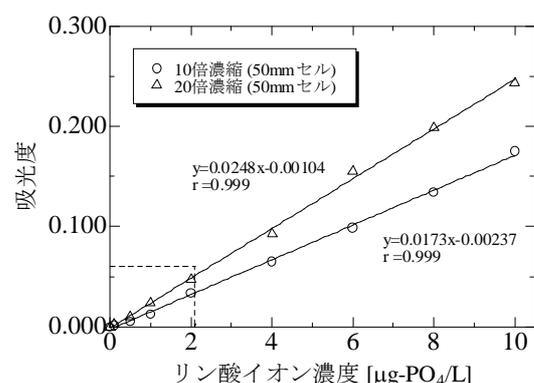


図3 メンブレン抽出法における検量線

メンブレン抽出法は、公定法における吸光高度法の後処理として実施可能であることから、T-Pの測定にも適用が可能である。ペルオキシ二硫酸カリウム法によってT-P測定法とメンブレン抽出法と組み合わせた。濃縮倍

率10倍とし、10mmセルで測定した結果を図4に示す。

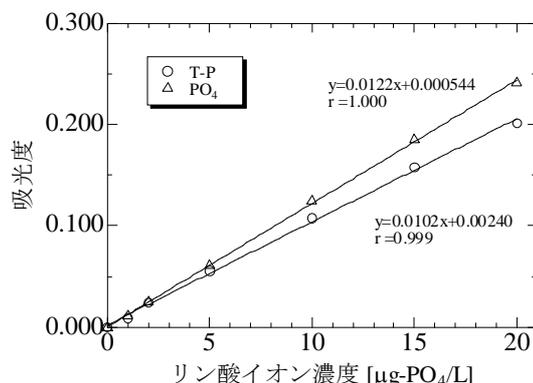


図3 メンブレン抽出法によるT-Pの検量線

(3)オンライン固相抽出法における試料供給条件

ODSカラムはモリブデンブルーとDTMAのイオン会合体に対する捕捉能力は必ずしも高いものでなく、試料5mLを供給する場合、50mmのカラムが必要であった。このとき、試料供給速度の影響を検討した結果、流速2mL/min以上で捕捉量が低下する傾向が認められたため、以降の測定では流速を1mL/minとした。

試料溶液にはモリブデンブルーとDTMAのイオン会合体の他に、未反応のモリブデン酸イオンとDTMAのイオン会合体、高濃度のモリブデン酸イオンや硫酸イオン等の多くの溶質が共存しており、測定誤差の要因となると共にカラムの耐久性にも問題があると考えられる。共存物質除去のために、試料供給後に純水でカラムを洗浄する必要がある。洗浄用の純水の供給速度を1mL/minとして、洗浄水量を1~11mLの範囲で変化させた結果、イオン会合体に対応するピーク面積は洗浄水量が6mLまでは急激に減少し、共存物質の影響が認められた。洗浄水量が6mL以上ではピーク面積は安定していたことから、洗浄水量を8mLとした。

(3)イオン会合体の溶離条件

捕捉されたイオン会合体を溶離するための溶媒としては、水との親和性が高い極性有機溶媒が必要であり、 CH_3OH 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 、 CH_3CN の水溶液について検討した結果、 CH_3CN が最も適切な溶媒であった。 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ の割合を変化させて検討した結果、移動相としては、 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=35/65$ 付近が最も適切であり、移動相流速を1mL/minとした場合、イオン会合体の保持時間は約1.5minであった。

イオン会合体が溶出した後、カラムに残留

している可能性がある共存物質を洗浄除去するために、100% CH₃CN を流速 2mL/min で 5 分間供給した。その後再度 CH₃CN/H₂O=35/65、1mL/min の条件で移動相を 3 分間供給した。なお、試料溶液を ODS カラムに供給する前には、カラムに純水を供給して、カラム内の溶媒を交換しておいた。

上述の溶出条 (isocratic mode) における blank 試料のクロマトグラムを図 4 に示す。明確なピークが認められたが、ベースラインが安定しておらず、測定精度を低下させる要因となった。そのため、以下の gradient mode で溶出を行った。0-1.5 min: CH₃CN: 30%, 1.5-5.5 min: CH₃CN: 35%, 5.5-10.5 min: CH₃CN: 100%, 10.5-13.5 min: CH₃CN: 35%。この条件では、ベースラインが安定し、かつ、blank 試料でもピークを検出することができた。

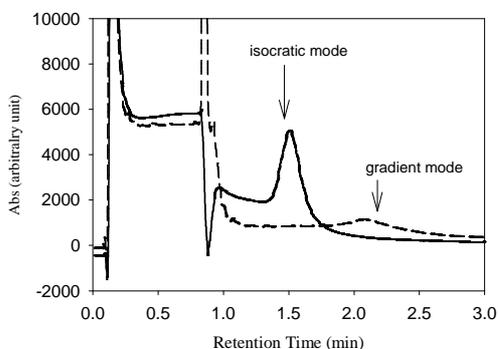


図 4 イオン会合体の溶離条件

(4) 検量線

上述の条件において、リン酸イオン標準溶液を用いて定量範囲と検出限界について検討を行った。リン酸イオン濃度として 1~200 μg-PO₄/L の標準溶液に対して得られた検量線を図 5 に示す。全濃度範囲において高い直線性を示し、最大定量範囲は 200 μg-PO₄/L であることが示された。この濃度は分光光度計によって測定可能な濃度範囲であることが指摘できる。本法は、このような広いダイナミックレンジが得られたことが特長のひとつであり、他の高感度あるいは超高感度測定法では、ダイナミックレンジは 2 桁程度である。この要因は、溶液の吸光度ではなくクロマトグラムのピーク面積に基づいた定量であることによる。

低濃度領域として、0.2~20 μg-PO₄/L の範囲における検量線を図 6 に示す。ここでは 3 回の繰り返し測定における平均値と標準偏差を示すが、相対標準偏差はほとんどの場合 2% 未満であった。ブランクの測定値の変動に基づき、S/N 比を 3 として検出限界を求めた結果、0.14 μg-PO₄/L であった。

本測定法においては、検水 25mL に対して

反応試薬が 4mL 添加されており、希釈効果が無視できない。反応試薬を 2mL 添加してもイオン酸イオンの測定は可能であり、その場合の検出限界は 0.1 μg-PO₄/L であった。しかしながら、この条件では Si の妨害を受けることが明らかとなった

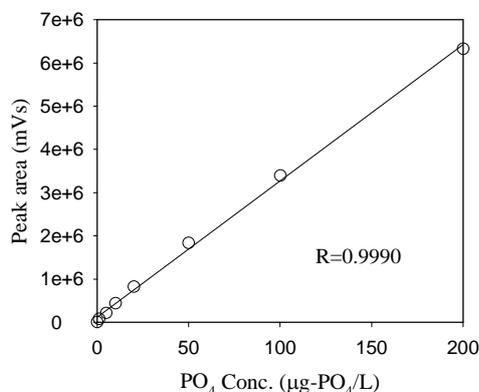


図 5 オンライン固相抽出法における検量線 (1~200 μg-PO₄/L)

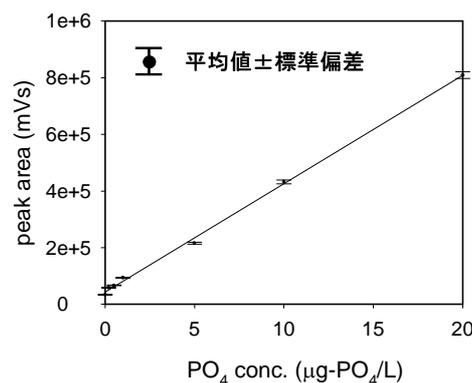


図 6 オンライン固相抽出法における検量線 (0.2~20 μg-PO₄/L)

(5) 妨害物質の影響

珪素(Si)もモリブデンブルーを形成するため正の誤差要因となる。Si の影響を低減するため、反応試薬に含まれる硫酸の濃度を変化させた。Si を 10mg/L 含む 10 μg-PO₄/L 標準溶液における呈色溶液における硫酸の規定度の影響を検討した。その結果、最終の硫酸濃度が 0.32~0.42N であれば、Si の誤差が 0.4% であることが示された。このことは、0.1 μg-PO₄/L リン酸イオンの測定においても、40% 程度の誤差にとどまる。

海水中のリン酸イオンを FIA によって測定する場合、高塩分濃度に起因する屈折率の変化が大きいため、海水用の標準溶液を用いる必要がある。本法では、モリブデンブルーのイオン会合体を抽出するため、塩分の影響を

低減できる可能性がある。NaCl 濃度を 3.5% としたリン酸イオン標準溶液を調整し、本法によって測定し、NaCl を含まない標準溶液の結果と比較を行った。その結果、0.2 $\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$ においても NaCl の影響は全く認められなかった。

(6)環境水の水質測定結果

豊川（愛知県）上流部の鳳来湖における表層水のリン酸イオン濃度の測定結果を表 1 に示す。FIA の測定結果は定量限界付近の値であったが、本法では確実に定量範囲内で測定が行えた。FIA の結果に比べて本法の結果の方が高い値を示したが、試料水の保存方法の影響によると考えられる。本法用のろ過水試料は冷凍保存であったが、FIA 用のろ過水試料は冷蔵保存であったため、微生物の増殖の影響が現れたものと考えられる。

表 2 鳳来湖表層水の PO_4 濃度
($\mu\text{g-PO}_4/\text{L}$)

採水月	地点	本法	FIA
8 月	1	1.73	1.13
	2	2.54	—
	3	1.68	1.78
	4	2.23	—
	5	2.98	4.42
10 月	1	2.72	1.99
12 月	1	3.06	2.48
	2	4.07	—
	3	4.63	2.30
	5	4.02	2.24

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)
[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木曾祥秋 (Kiso Yoshiaki)
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20144206

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：