

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289178

研究課題名(和文) 光導波路分光法を用いたオンサイト・リアルタイム網羅的環境中重金属分析技術の開発

研究課題名(英文) Development of on-site, real-time, multi-analytical technology of heavy metals in the environment based on optical waveguide spectroscopy

研究代表者

佐藤 久 (Sato, Hisashi)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80326636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、重金属リスクを今まで以上に低減するための効率的な分析技術が求められている。現在、重金属は大型の分析装置によって測定されている。これらの装置はオンサイトで分析ができない、分析精度は高いが分析に時間がかかる、分析に膨大なコストがかかる、などの問題がある。本研究では、重金属を簡便な前処理のみで、低コストで、オンサイトでスクリーニングできるセンサを開発した。ナノマテリアルを玄米溶出液と混合し、蛍光スペクトルを測定することで玄米中Cd濃度を算出した。これらの値は公定法により求めた玄米中Cd濃度とおおむね一致した。

研究成果の概要(英文)：Simple analytical methods are needed for determining the cadmium (Cd) content of brown rice samples. In the present study, we developed a new analytical procedure. Digestion with 0.1 M HCl for 10 min at room temperature was sufficient to extract Cd from the ground rice samples. The Cd in the extract was successfully purified in preference to other metals using Dowex 1X8 chloride form resin. Low concentrations of Cd in the eluate could be determined using fluorescence spectroscopy with a fluoroionophore. Overall, the actual limit of quantification value for the Cd content in rice was about 0.1 mg/kg, which was sufficiently low compared with the regulatory value (0.4 mg/kg) given by the Codex Alimentarius Commission. We analyzed authentic brown rice samples using our new analytical procedure and the results agreed well with those determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES).

研究分野：水環境工学

キーワード：センサ

1. 研究開始当初の背景

重金属の発生源には自然起源(地下水、廃坑、温泉)と人為起源(各種工業で発生する廃水や排ガス)がある。我が国は足尾銅山鉛毒事件、水俣病、イタイタイ病などの重金属由来の公害を経験した。現在、中国やインドなどを始めとする新興国では重金属の不適切な処理および管理の結果、極めて深刻な環境汚染が問題となっている(経済産業省「平成23年度海外の環境汚染・環境規制・環境産業の動向に関する調査」)。重金属は微量でも摂取すると健康を害するため、世界各国の水道水質基準、排水基準、環境基準項目に含まれている。

2013年、水俣市で水銀の鉱出、製品製造、貿易を禁止する「水銀条約」が採択された。昨年、コメのカドミウムの規格基準がより低濃度(0.4ppm)に改正された。平成23年に土壤汚染対策法が改正され対象土壌の範囲が拡大した。近年のこのような法改正により、重金属リスクを今まで以上に低減するための効率的な分析技術が求められている。

現在、重金属は国内外を問わずICP法、原子吸光法などの大型の分析装置によって測定されている。これらの装置は、オンサイトで分析ができない、分析精度は高いが分析に時間がかかる、分析に膨大なコストがかかる、などの問題がある。オンサイト分析法として、ボルタンメトリー法、電気化学的分析法、比色法などがある。これらの方法は検出限界値が高い、一斉分析できない、他の物質の障害を受ける、といった問題がある。すなわち、既存の技術では、環境中(水道水源、排水、河川水、湖沼水、土壌、廃棄物、食品)の重金属をオンサイトで頻りに網羅的にリアルタイムモニタリングし、汚染が確認された場合に迅速に対応することは不可能である。

2. 研究の目的

本研究では、ICPのような高い分析精度は目標にせず、重金属を酸処理などの簡便な前処理のみで、低コストで、オンサイトでスクリーニング(環境基準を超過しているか否かを判別)できるセンサを開発する。これを達成するために、特定の重金属を補足すると蛍光色に変化するナノマテリアル(NM)を新規に開発する。

3. 研究の方法

玄米 20 g を Labo Milser LM-PLUS (OSAKA CHEMICAL) を用いて 30 秒間粉碎した。粉碎した玄米を 80 mL の 0.1M HCl 溶液に添加し 10 分間攪拌した。この上澄みを 10,000 rpm で 10 分間遠心分離した。さらに上澄水をメンブレンフィルター(1.0 μm, ADVANTEC)で吸引ろ過した。このろ液 20 mL を陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通水し、続いて 0.1M HCl を 40 mL カラムに通すことで樹脂を洗浄した。その後、カラム

に Milli-Q 水を 30 mL 通し樹脂に保持されたイオンを溶出させた。カラムから流出したサンプルろ液、HCl 溶液、Milli-Q 水をそれぞれ、流出液、洗浄液、溶出液と称する。これらの溶液の金属濃度を ICP-OES (島津製作所; ICPE-9000) を用いて分析した。

10 mL メスフラスコに、NM の一つである BDP-TPY のアセトニトリル溶液 5 mL (最終濃度 1 μM)、溶出液 4.5 mL、80 mM 緩衝液 (Tris, pH=10.2) 0.5 mL を順に添加し混合した。この混合液の蛍光スペクトルを分光蛍光光度計 (日本分光、V-630) を用いて分析した。励起波長は 525 nm とした。あらかじめ作成しておいた検量線を用いて玄米中 Cd 濃度を定量した。この結果を ICP-OES で分析した結果と比較した。

4. 研究成果

玄米からの Cd 抽出率(塩酸抽出による Cd 濃度を公定法で抽出した Cd 濃度で除した値)の平均値は $97.2 \pm 11.0\%$ ($n=7$) であった。また、認証標準物質 3 サンプルの Cd 抽出率の平均値は $76.3 \pm 3.2\%$ ($n=3$) であった。塩酸の濃度、攪拌時間を変更させた際も有意な差は見られなかったことから、玄米からの Cd 抽出に関する最適な条件は「0.1M HCl を用い 10 分間攪拌すること」であると考えられた。認証標準物質において抽出率が低かった理由として、HCl では玄米中の抽出しやすい Cd (無機態) のみが抽出され、HCl では抽出できない Cd (キレートおよび有機態 Cd など) は抽出されなかったことが考えられた。

流出液(F.T.)、洗浄液(W.)、溶出液中(Elu.)の Cd、Zn、Cu、Fe の存在割合を図 1 に示す。Cd 回収率は $104 \pm 5\%$ 、Zn 除去率は $103 \pm 2\%$ 、Cu 除去率は $100 \pm 5\%$ 、Fe 除去率は $64 \pm 30\%$ であり、溶出液中に Cd 以外の金属はほとんど検出されなかった。この結果から、本研究で開発した前処理法が Cd の精製

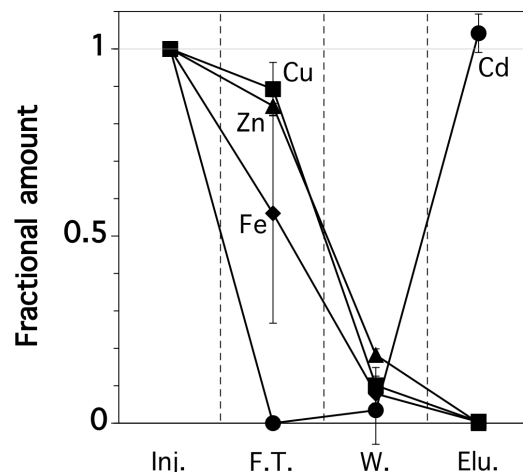


図 1 流出液 (F.T.)、洗浄液 (W.)、溶出液中 (Elu.) の Cd、Zn、Cu、Fe の Fractional amount (存在割合)

に極めて有効であることが明らかとなった。

BDP-TPY を用いて検量線を作成した。BDP-TPY 濃度は $1\ \mu\text{M}$ で一定とし、Cd 標準溶液は Cd^{2+} 濃度 0、0.1、0.2、0.3、0.5、0.7、1.0、2.0、 $5.0\ \mu\text{M}$ に設定した。BDP-TPY アセトニトリル溶液 5 mL および Cd 標準溶液 4.5 mL、80 mM 緩衝溶液 (Tris-HCl) 0.5 mL を 10 mL メスフラスコに入れ、蛍光用セルに移し、蛍光分光器 (日本分光, FP-6600) を用いて蛍光スペクトルを測定した。BDP-TPY のみでは蛍光スペクトルは 541 nm に蛍光極大波長を示したが、 Cd^{2+} 濃度の増加に伴い、蛍光色素由来の 541 nm の蛍光強度が減少し、新たに Cd^{2+} と BDP-TPY の錯体由来の 562 nm の蛍光強度が増大した。この二波長の蛍光強度の比を新たに $R (=F_{562}/F_{541})$ と定義し、横軸に Cd^{2+} 濃度 (μM)、縦軸に R をプロットすることで検量線を作成した。ブランクサンプルの蛍光スペクトルを 10 回測定し、その標準偏差の 3 倍および 10 倍の値から、検出限界値および定量下限値をそれぞれ算出した。検出限界値は $0.06\ \mu\text{M}$ (コメ中 Cd 濃度は $0.04\ \text{mg/kg}$)、定量限界は $0.19\ \mu\text{M}$ (コメ中 Cd 濃度は $0.13\ \text{mg/kg}$) であった。

BDP-TPY を溶出液と混合し、蛍光スペクトルを測定し、作成した検量線から玄米中 Cd 濃度を算出した。これらの値と公定法により求めた玄米中 Cd 濃度を比較した (図 2)。ICP-OES と蛍光分光法により算出した Cd 濃度は同程度であり、ほとんどのデータは図 2 中の傾き 1 の直線近傍に分布した。最も低濃度のサンプル ($0.068\ \text{mg/kg}$) は分析玄米量および抽出液量を 2 倍に変更し測定したものである。この値は日本の玄米中 Cd 濃度の平均値程度である。このように、分析玄米量および抽出液量の比率を高めると、カラムにより Cd が濃縮されるので、本法の定量下限値

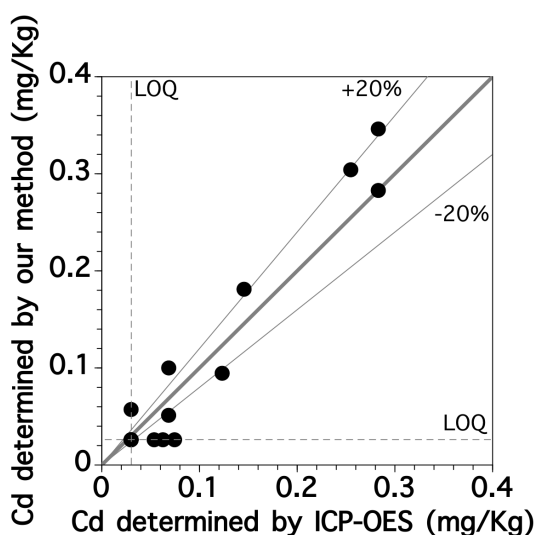


図 2 本法により測定した Cd 濃度 (縦軸) と公定法により求めた測定した Cd 濃度 (横軸) の関係

は低下する。玄米抽出液に Cd^{2+} を添加したデータも ICP-OES のデータと同程度となった。標準試料の蛍光分光法による測定結果は ICP-OES の測定結果と比べ値が低かった。これは特殊な条件下で生育された標準試料は HCl で抽出することができない形態の Cd を含んでいることが原因であると考えられる。

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)

[学会発表] (計 8 件)

Hisashi Satoh “DNA Aptamer: Its Principles and Applications” IEEE-NEMS 2016. April 17-20, 2016, Matsushima, Japan.

佐藤 久・奥山 優・中原 禎仁・高橋 正宏・岡部 聡 DNA アプタマーを用いた簡易ヒ素分析手法の開発。水道研究発表会。2016 年 11 月 9 日～11 日、京都市。

奥山 優・高橋 正宏・岡部 聡・佐藤 久 DNA アプタマーを用いた簡易ヒ素イオン分析手法の開発。第 53 回環境工学研究フォーラム。2016 年 12 月 6 日～8 日、北九州市。

山口 拓郎・高橋 正宏・岡部 聡・佐藤 久 光學式重金属センサの開発。第 53 回環境工学研究フォーラム 2016 年 12 月 6 日～8 日、北九州市。

吉原 光・高橋 正宏・岡部 聡・佐藤 久 簡易水銀イオン分析手法の開発。第 53 回環境工学研究フォーラム。2016 年 12 月 6 日～8 日、北九州市。

奥山 優・岡部 聡・高橋 正宏・佐藤 久・大沼 章子・加藤 昌志 DNA アプタマーを用いた簡易ヒ素分析手法の開発。第 51 回日本水環境学会年会 2017 年 3 月 15 日～17 日、熊本市。

山口 拓郎・岡部 聡・高橋 正宏・佐藤 久 DNA アプタマーを用いた簡易カドミウム分析手法の開発。第 51 回日本水環境学会年会。2017 年 3 月 15 日～17 日、熊本市。

吉原 光・高橋 正宏・岡部 聡・佐藤 久 水銀イオンと DNA チミン塩基の塩基対形成能を利用した簡易水銀分析手法の開発。第 51 回日本水環境学会年会。2017 年 3 月 15 日～17 日、熊本市。

[その他]

ホームページ等

[http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/
contents/HisashiSatoh/2Res/Japanese/5Pr
esen.html](http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSatoh/2Res/Japanese/5Pr
esen.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 久 (SATO, Hisashi)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：80326636

(2) 研究分担者

山田 幸司 (YAMADA, Koji)
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・
准教授
研究者番号：30348825

山村 寛 (YAMAMURA, Hiroshi)
中央大学・理工学部・准教授
研究者番号：40515334