

機関番号：11301  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20350070  
 研究課題名（和文） 社会安全性確保を志向した土壤中の超微量重金属イオンの  
 簡易迅速化学計測法の開発  
 研究課題名（英文） Development of Facile and Rapid Method for Determination of  
 Ultratrace Amount of Heavy Metal Ions in Soil Aiming at Secure Society  
 研究代表者  
 壹岐 伸彦 (IKI NOBUHIKO)  
 東北大学・大学院環境科学研究科・准教授  
 研究者番号：50282108

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は社会安全性確保を志向し、土壤中交換態 Cd, Pb など重金属の簡易迅速定量法を開発することを目標とした。まずチアカリックス[4]アレーンを土壤検液作成時に用い、溶出時間を6時間から10分に短縮し、迅速化した。次いでチオセミカルバゾン配位子を本検液に添加し、生成した錯体をHPLCに供することで、土壤マトリクス成分の影響を受けない、ppbレベルの高感度検出を可能とする高性能化学計測法を開発することに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

This study was aimed at developing a facile and rapid method to determine exchangeable heavy metal ions such as Cd and Pb in soil. In the first step, thiacalix[4]arene was utilized as the extractant to accelerate the leaching processes from 6 h to only 10 min, owing to the complexation ability toward Cd and Pb. This step was followed by quantitative ligand replacement with the thiosemicarbazone ligand, the resulting complex of which was then subjected to kinetic differentiation mode HPLC to enable highly selective and sensitive detection of exchangeable Cd and Pb at the ppb levels without interference from soil matrices.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：化学計測，環境分析，土壤汚染，重金属，簡易分析法，チアカリックスアレーン

## 1. 研究開始当初の背景

重金属による土壤汚染は地下水系への汚染の拡大、農産物汚染や、土地資産価値の下落など、社会的な影響を長期にわたり発生させる懸念がある。土壤が汚染されたと推定される場合、先ず第一に土壤汚染の評価が重要である。日本では平成15年に土壤汚染対策

法が施行され、土地所有者に対してリスク評価・管理が義務づけられ、土壤汚染の評価法に対するニーズが高まっている。土壤汚染対策法では、重金属が雨水により地下水へ溶け出すリスクを評価するため、溶出試験を課している。本試験では土壤中重金属の蒸留水への溶出の平衡化の要件から、検液作成に6時間もの長時間を要する。これは多検体測定を

必要とする本試験の大きな難点であり、迅速性、簡易性といった意味での高性能化が課題である。一方、土壤検液中の重金属の定量法としては誘導結合プラズマ(ICP)-原子発光法(AES)や質量分析法(MS)など原子分光学的手法が多用されるが、これらはランニングコストが高く、高度なインフラを備えた実験室が必要で現場分析に不向きであるなど、様々な制限を有しており、これらは看過できない問題となっている。社会安全性の確保のためにはこれを解決する新手法が求められる。

## 2. 研究の目的

本研究では現行の土壤中の交換態重金属測定法の問題をクリアすべく、簡易性、迅速性を兼ね備えた新しい高性能・高感度化学計測法を開発することを目的とした。具体的には、土壤検液調製だけではなく重金属定量法の簡易迅速化も含めたトータルシステムの高性能化を検討した。我々は $\text{Cd}^{\text{II}}$ 、 $\text{Pb}^{\text{II}}$ 、 $\text{Hg}^{\text{II}}$ といったソフト金属イオンと選択的に錯形成する配位子チアカリックス[4]アレーン-*p*-テトラスルホン酸(TCAS, Iki, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **64**, 1, 2009)に注目し、これを土壤検液調製の際に抽出剤として用いれば、これらの重金属を選択的かつ迅速に抽出し、検液作成時間を短縮できると考えた。一方、定量法としては上記の諸制限をクリアする化学計測法である速度論的識別モード(Kinetic Differentiation mode, KD)-高速液体クロマトグラフィー(HPLC, 壹岐, 他, *Mikrochim. Acta*, **113**, 137, 1994)の利用を着想した。KD-HPLCはICP-AESに匹敵する感度を有するばかりでなく、マトリクスの分離能および金属錯体の速度論的安定性の識別機能による高選択性を有するため、土壤溶液のような複雑系試料中の重金属イオンの定量に有効であると考えた。これらの着想を基に、TCAS抽出法とKD-HPLCを結合させた化学システムを構築し、土壤中重金属溶出試験の高性能化を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1)TCAS抽出法

土壤標準試料として日本分析化学会JSAC0401を用いた。TCASと重金属イオンとの錯形成能を光度滴定法、モル比法により評価した。土壤抽出は50 mL遠沈管に土壤試料1.0 gとpH緩衝剤を含む $1.0 \times 10^{-5}$  M TCAS溶液を10 mL加え、200 stroke/minで所定時間振とうして行った。3000 rpmで20分遠心分離した後、上澄みをシリンジで採取し、メンブレンフィルター(孔径0.45  $\mu\text{m}$ )で濾過し、

検液とした。一方公定法としてTCAS溶液の代わりに蒸留水10 mLを用いて同様の操作を行った。TCAS法によって抽出される土壤中重金属の結合形態をBCR逐次抽出法(C. M. Davidson, 他, *Anal. Chim. Acta*, **363**, 45, 1998)により評価した。抽出した金属イオンをフレームレス原子吸光度計(Varian SpectrAA-600)で定量した。

### (2)配位子置換誘導体化KD-HPLC法

20 mLメスフラスコに土壤検液、ジアセチルビス(4-フェニル-3-チオセミカルバゾン)(DBS, 図1)のDMF溶液を1 mL、0.5 M TAPS緩衝液(pH 9.0)を0.4 mL加え、全量20 mLとし(DMF 80%), 20  $\mu\text{L}$ をKDモード吸光検出HPLCシステムに供した。酢酸ナトリウム0.01 Mを含むアセトン-水54 v/v%を溶離液として用い、10-17 minにおいてアセトン分率を54%から80%に増加させるグラジエント送液を行った。検出波長を425 nmとした。

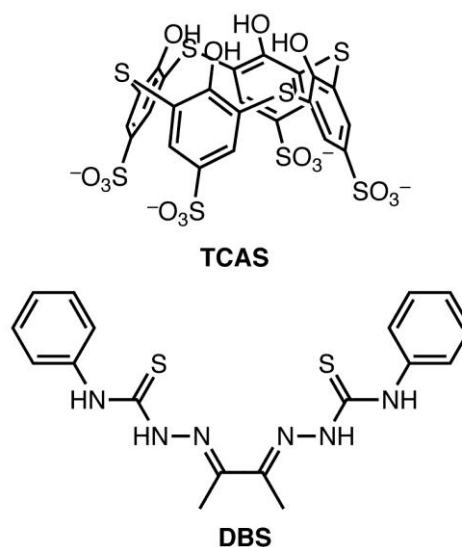


図1 使用した配位子

## 4. 研究成果

### (1)TCAS抽出法

TCASは $\text{Cd}^{\text{II}}$ および $\text{Pb}^{\text{II}}$ イオンとpH>5で迅速に錯形成し、2:1(=M:TCAS)錯体を与えた。TCAS法による抽出金属濃度の経時変化を調べたところ、最初の10 minで抽出量が急激に増加し、その後は一定となった(図2)。これよりTCAS法における抽出時間を10 minとした。平衡時での重金属の抽出量はTCAS法(10 min)と公定法(6 h)とで同程度であった。またTCAS法と公定法での抽出金属濃度のpH依存性を調べたところpH 7.0において最大となり、TCASの錯形成が寄与していることが

示唆された。土壤検液中の共存物の指標として  $Al^{III}$  に注目し、その溶出量を調べたところ、TCAS 法と公定法で同じ時間依存性を示した。これより TCAS は重金属を選択的に抽出することが示された。さらに 10 min での  $Al^{III}$  溶出量は 6 h での 1/3 となり、迅速な抽出により土壤マトリクス成分の溶出を低減させ、重金属定量時における共存物の妨害を減少させる可能性が示唆された。

一方、TCAS が土壤成分のどの形態の重金属を抽出するか調べるために、TCAS 抽出前後の土壤の各画分量を BCR 法により調べた (図 3)。その結果、TCAS は交換態-炭酸塩結合態画分の  $Cd^{II}$  の 67%、 $Pb^{II}$  の 89% を抽出し、Fe-Mn 水和酸化物結合体画分の  $Cd^{II}$  の 57% を抽出することがわかった。一方フミン質などの有機物や硫化物イオンに結合している重金属は TCAS によって抽出されないことがわかった。以上より TCAS が抽出するのは溶出しやすい、土壤汚染に関与する画分の重金属であることがわかり、溶出試験の対象に合致することが示された。

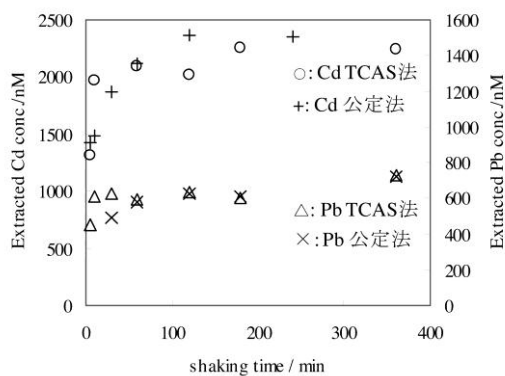


図2 TCAS 存在下および非存在下における Cd および Pb の抽出率の時間依存性

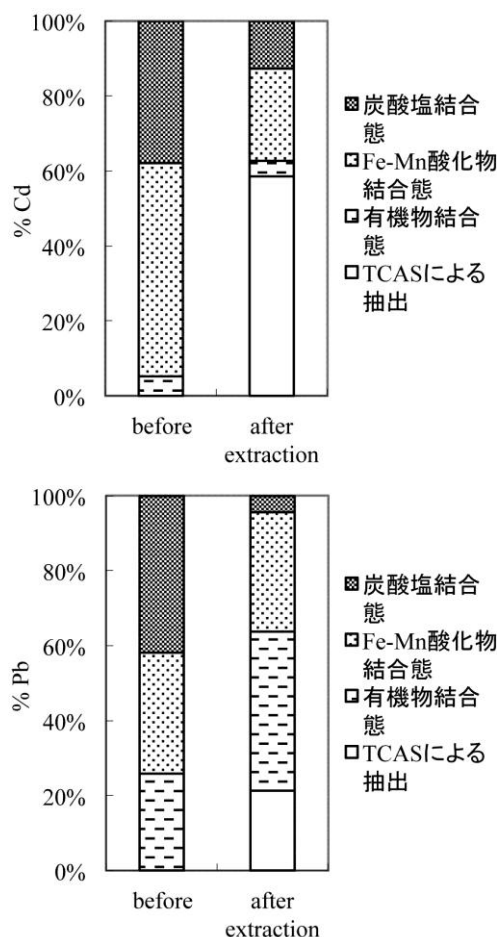


図3 TCAS 抽出前後のBCR 逐次抽出法による溶出画分の決定。土壤試料: JSAC0401, 1 g.

## (2)配位子置換誘導体化 KD-HPLC 法

KD-HPLC で重金属イオンを検出する配位子として DBS を選択した(星座, 他, 分析化学, 35, 819, 1986)。DBS は  $Cd^{II}$ ,  $Pb^{II}$ , および  $Hg^{II}$  と  $pH > 6$  で定量的に錯形成する。上記の溶離条件で金属は良好に分離検出された(図 4)。本法の検出限界は  $Cd^{II}$ ,  $Pb^{II}$ , および  $Hg^{II}$  でそれぞれ 0.63, 2.7, 0.91 ppb となり, Hg を除き土壤溶出試験環境基準 (それぞれ 10, 10, 0.5 ppb) を下回った。よって本系は Cd, Pb 汚染の有無の判断に適用可能な感度を持つことが示された。TCAS 法で得られた土壤検液について DBS の DMF 溶液を加えたところ,  $Cd^{II}$  および  $Hg^{II}$  は速やかに DBS 錯体を与えたが,  $Cd^{II}$  については錯形成が不十分であった。これは検液中の  $Cd^{II}$ -TCAS 錯体の置換反応が遅いためと考えられる。そこで土壤検液に硝酸を 25 mM となる様に加え  $Cd^{II}$ -TCAS 錯体を一旦解離させ, そこに DBS を加え再度 pH を上昇させ配位子置換反応を完了させた。 $0.1 \times 10^{-6}$  M の Cd および Pb に対する各種金属イオンの許容限界を調べたところ, Cu, Co, Ni,

Mn, Znは10倍量の存在を許容した。また, Feについてはマスキング剤として系に $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ のFを添加すれば100倍量の存在を許容した。実際の土壌試料から得られた溶出液に $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ のCd, Pbをスパイクし(図5), 回収率を求めたところそれぞれ101, 94%となり配位子置換誘導体化KD-HPLC法の高い信頼性を示す結果となった。また溶出液中のCdについて計測値をフレームレス原子吸光法とクロスチェックした結果, 良好な一致を見た。

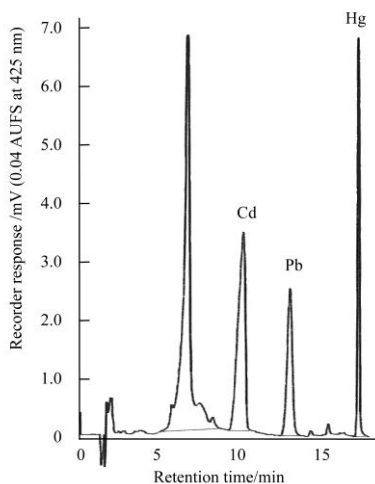


図4 クロマトグラム例.  $C_{\text{DBS}} = 2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $C_{\text{Cd}} = C_{\text{Pb}} = C_{\text{Hg}} = 4.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ , TAPS = 0.01 M pH = 9.85. Conditions: Mobile phase; 54 → 80 v/v% (10 → 17 min) acetone-water containing 0.01 M sodium acetate. Flow rate 1.0 ml/min, sample size; 20  $\mu\text{L}$ .

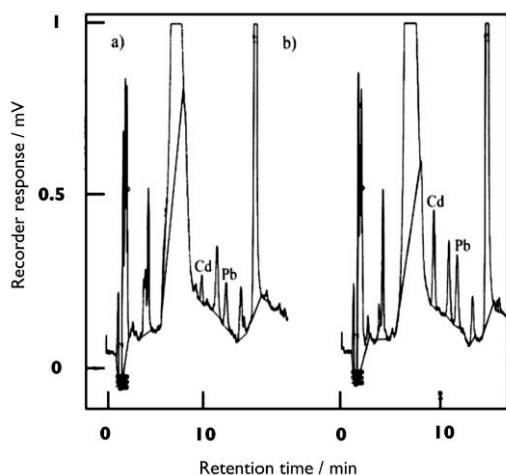


図5 土壌試料のクロマトグラム例. a) Sample, b) Sample + 0.1  $\mu\text{M}$  Cd and Pb

以上, 迅速かつ選択的なTCAS抽出とDBSによる配位子置換誘導体化, 高感度性を有するKD-HPLC分離検出を結合させ, 土壌中Cd

およびPbの簡易迅速化学計測システムを完成し, 溶出試験の高性能化に成功した。今後検液の濃縮を組み合わせ高感度化を図り, Hgなどに対象金属を広げる予定である。

## 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)

[雑誌論文] (計14件)

1. Highly Efficient Near-Infrared-Emitting Lanthanide(III) Complexes Formed by Heterogeneous Self-Assembly of AgI, Ln<sup>III</sup>, and Thiocalix[4]arene-p-tetrasulfonate in Aqueous Solution (Ln<sup>III</sup> = Nd<sup>III</sup>, Yb<sup>III</sup>), Nobuhiko Iki,\* Shouichi Hiro-oka, Teppei Tanaka, Chizuko Kabuto, and Hitoshi Hoshino, *Inorg. Chem.*, **51**(3), 1648–1656 (2012). (査読有)
2. pH-Responsive Switching of Near-Infrared Absorption of a Diradical Complex of Pt<sup>II</sup> and 3,4-Diaminobenzoate Formed in Aqueous Solutions, Kousaku Tamura, Atsuko Masuya, Nobuhiko Iki,\* Yasunori Ohba, Seigo Yamauchi, and Hitoshi Hoshino, *Inorg. Chim. Acta*, **378**, 81–86 (2011). (査読有)
3. Designing strategies for supramolecular luminescent complex of lanthanide-heterometal assembly, Nobuhiko Iki,\* *Supramol. Chem.*, **23**(1), 2011, 160–168. (査読有)
4. pH-Responsive Switching of the Near-Infrared Absorption of the Water-Soluble Bis(o-diiminobenzo-semiquinonato)platinum(II) Complex, Atsuko Masuya, Nobuhiko Iki\*, Chizuko Kabuto, Yasunori Ohba, Seigo Yamauchi, Hitoshi Hoshino, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2010**(22), 3458–3465 (2010). (査読有)
5. A Supramolecular Sensing System for Ag<sup>I</sup> at Nanomolar Levels by Formation of Luminescent Ag<sup>I</sup>-Tb<sup>III</sup>-Thiocalix[4]arene Ternary Complex, Nobuhiko Iki,\* Munehiro Ohta, Teppei Tanaka, Takayuki Horiuchi, and Hitoshi Hoshino, *New J. Chem.*, **33**, 23–25 (2009). (査読有)
6. One-step heterogeneous assembly of terbium(III) and silver(I) with thiocalix[4]arene ligands to form a cage including terbium(III) in an octa-oxygen cube, Teppei Tanaka, Nobuhiko Iki\*, Takashi Kajiwara, Masahiro Yamashita and Hitoshi Hoshino, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **64**(3-4), 379–383 (2009). (査読有)

7. Expanding the Scope of CE Reactor to ssDNA-binding protein-ssDNA Complexes as Exemplified for a Tool for Direct Measurement of Dissociation Kinetics of Biomolecular Complexes, Toru Takahashi\*, Kei-ichirou Ohtsuka, Yoriyuki Tomiya, Nobuhiko Iki, Hitoshi Hoshino, *Electrophoresis*, **30(17)**, 3079–3085 (2009). (査読有)
8. Detection of Cationic Guest Molecules by Quenching of Luminescence of a Self-assembled Host Molecule Consisting of Tb<sup>III</sup> and Calix[4]arene-*p*-tetrasulfonates, Takayuki Horiuchi, Nobuhiko Iki\*, and Hitoshi Hoshino, *Anal. Chim. Acta*, **650(2)**, 258–263 (2009). (査読有)
9. Ligand-Substitution Mode Capillary Electrophoretic Reactor (CER). Extending CER toward Measurement of Slow Dissociation Kinetics with a Half-Life of Hours, Nobuhiko Iki\*, Mariko Takahashi, Toru Takahashi, and Hitoshi Hoshino, *Anal. Chem.*, **81(18)**, 7849–7854 (2009). (査読有)
10. Non-covalent strategy for activating separation and detection functionality by use of the multifunctional host molecule thiacalixarene, N. Iki\*, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **64 (1-2)**, 1–13 (2009). (査読有)
11. Exceptionally Long-Lived Luminescence Emitted from Tb<sup>III</sup> Ion Caged in an Ag<sup>I</sup>-Tb<sup>III</sup>-Thiacalix[4]arene Supramolecular Complex in Water, Nobuhiko Iki\*, Munehiro Ohta, Takayuki Horiuchi, Hitoshi Hoshino, *Chem. Asian J.*, **3**, 849–853 (2008). (査読有)
12. 水溶液中におけるテトラヒドロクルクミンの酸化安定性と酸解離特性の評価, 佐藤きよ子\*, 壹岐伸彦, 高橋 透, 星野 仁, *分析化学*, **57(4)**, 257–264 (2008). (査読有)
13. Hydrophobic and metal coordination interacted architecture based on *p*-tert-butylthiacalix[4]arene-potassium complex and its vapor absorption capability, Manabu Yamada, Yoshihiko Kondo, Nobuhiko Iki, Chizuko Kabuto, and Fumio Hamada\*, *Tetrahedron Lett.*, **49(24)**, 3906–3911 (2008). (査読有)
14. Highly Luminescent Superparamagnetic Diterbium(III) Complex Based on the Bifunctionality of *p*-tert-Butylsulfonycalix[4]arene, Takashi Kajiwara\*, Miki Hasegawa, Ayumi Ishii, Kensuke Katagiri, Munkhtsetseg Baatar, Shinya Takaiishi, Nobuhiko Iki, Masahiro

Yamashita, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 5565–5568. (査読有)

[学会発表] (計 37 件)

1. Highly Selective and Sensitive Method to Determine ppb Levels of Exchangeable Cd and Pb in Soil Using Rapid Leaching with Thiacalixarene and Detection with Kinetic-Differentiation Mode HPLC, N. Iki, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, Kyoto, May 23, 2011.
2. Highly selective and sensitive method to determine ppb levels of exchangeable Cd and Pb in soil using rapid leaching with thiacalixarene and detection with kinetic differentiation mode HPLC, N. Iki; K. Kano; H. Hoshino, Pacificchem 2010, Honolulu, USA, December 16, 2010.
3. Capillary electrophoretic reactor and microchip capillary electrophoretic reactor: Capillary electrophoresis based direct measurement method for the dissociation kinetics of metal complexes and biomolecular complexes. T. Takahashi; N. Iki; H. Hoshino, Pacificchem 2010, Honolulu, USA, December 16, 2010.
4. Supramolecular functions of luminescent complexes formed via self-assembly of silver(I), lanthanide(III), and thiacalix[4]arene in aqueous solutions, N. Iki, First International Conference on Luminescence of Lanthanides, Odessa, Ukraine, September 7, 2010.
5. A test method for soil contamination with Cd and Pb consisting of selective extraction with thiacalixarene and detection by using atomic absorption spectrometry, Nobuhiko Iki, Keita Kano, Hitoshi Hoshino, Pittsburg Conference 2010, Orlando, Florida, February 28-March 5, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~analchem/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

壹岐 伸彦 (IKI NOBUHIKO)

東北大学・大学院環境科学研究科・准教授

研究者番号 : 50282108

(2)研究分担者

星野 仁 (HOSHINO HITOSHI)

東北大学・大学院環境科学研究科・教授

研究者番号：20124620

高橋 透 (TAKAHASHI TORU)  
東北大学・大学院環境科学研究科・助教  
研究者番号：30361166

(3)連携研究者  
なし