

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550098

研究課題名(和文) 反射吸光度検出器と固相抽出法を組み合わせた環境汚染物質の現場定量法の開発

研究課題名(英文) Development of field determination methods for environmental pollutants using reflective absorbance detector and solid-state extraction

研究代表者

鈴木 保任 (SUZUKI, Yasutada)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：20262644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：様々な物質を低い濃度まで簡単に測定するには高価な分析装置が必要になる。本研究では低濃度の物質(環境汚染等に関係するリン、銅、マンガンなど)を発色試薬と反応させた後、フィルターでろ過して補集する方法に着目した。フィルターに補集した物質の発色の度合いを直接測定できる装置として、光源に発光ダイオードを用いる手のひらサイズの装置を開発した。低消費電力で電池駆動も可能なので、現場での分析も可能である。この装置、方法により、高価な装置を用いることなく、リンなどの環境汚染物質やフェロシアン化物のような食品添加物を高感度に測定することができた。

研究成果の概要(英文)：Expensive analytical equipments are necessary to determine various substances with high sensitivity. In this work, solid-phase extraction with a membrane filter was used to concentrate the substances in the sample, such as phosphorous, copper, and manganese. They were colored by the specific reagents and were collected on the filter. We have developed an LED-based, palm-top size reflective absorbance detector to measure the concentration of the substance on the filter directly. Thus the high sensitivity for the determination of phosphorous in natural water and ferrocyanide in common salt, and so on, has been attained without an expensive equipment with the combination of this detector and solid-state extraction.

研究分野：分析化学

キーワード：フィルター濃縮法 簡易分析 環境分析 反射型吸光度検出器

1. 研究開始当初の背景

土壌汚染対策法では、土地の譲渡などに際して汚染状況を調査し、汚染が確認された場合には客土等により汚染を除去することが義務づけられている。汚染除去に要する費用や期間が膨大になることは元より、調査についても多大な費用が必要となる。研究代表者は以前より主に発光ダイオード (LED) を光源として用いる手の平サイズの比色計を開発し、種々の元素の現場定量に応用してきた。このうち、クロム (VI) のジフェニルカルバジドを用いる吸光度定量法は、東京都の定める土壌の簡易分析法として採用されている。

このような簡易分析法としては、他にストリップングポルタンメトリーのような電気化学的手法、ポータブル型の蛍光 X 線装置を用いるものなどがあるが、いずれも吸光度法と比較すると高価である。そこで、簡単な操作で目的物質の濃縮が可能な固相抽出法に着目し、これと組み合わせて用いる反射吸光度検出器と自動前処理装置を開発すれば、有害物質を迅速、簡便かつ高感度に測定することが可能となる。

ろ過操作によってフィルター上に目的物質を濃縮する手法は、富山大の田口らや島根大の奥村ら、山形大の遠藤らの先駆的な研究があり、様々な化合物の濃縮に応用されている。キレート試薬等により発色させた状態で濃縮する方法も種々開発されているが、定量の際にはフィルターごと溶媒に再溶解して溶液化する方法や、目視により半定量する方法が多く、フィルター表面の反射吸光度を測定して定量する報告はあまりない。これは、薄層クロマトグラフィーに用いられるデンストメーターやマルチチャンネル分光器を利用した反射吸光度検出器、あるいは色彩色差計などの装置は高価で、現場に持ち出すのが困難なためである。

2. 研究の目的

本研究では、フィルター濃縮法と組み合わせて利用できる、LED を光源とする安価で簡便な吸光度検出器を開発し、種々の試料に含まれる様々な成分を高感度に測定することを目的とした。

ろ過用のフィルターには、市販のメンブレンフィルターを用いる汎用的な方法と、すでに商品として販売されている目視分析キットに付属する専用の小型フィルター (フィルターチップ) を用いる方法の 2 つを用いて比較し、測定の精度 (定量値の安定性) や感度の向上を目指した。また、測定操作 (試料と試薬の混合、反応) を自動化することで、より簡便な測定を実現することを目的とした。

対象物質としては、食塩の凝固防止剤として添加が認められているフェロシアン化物、及び環境水に含まれているリン、銅、マンガ、及びクロムの定量を検討し、その性能を評価した。

3. 研究の方法

(1) 吸光度検出器の開発

一般に市販されている 25 mm 径のフィルターの表面反射率を測定できる、430 (青紫色) から 740 nm (深紅色) までの 8 波長同時測定が可能な吸光度検出器と、市販の目視定量分析キット (パックテストズーム) に付属する小型 (約 7 mm 径) のフィルターを内蔵したろ過用チップの表面反射率を 430, 515, 620, 740 nm の 4 波長を測定できるものの 2 種類を試作した。

本装置ではまずブランク (試料を保持していないフィルター) の各波長における反射光強度 (I_0) を測定して記憶し、続いて試料を保持したフィルターの反射光強度 (I) を測定して、ブランクの値との比を取ることで各波長の反射率 ($R = I / I_0$) を求めた。反射率から反射吸光度 ($A = -\log_{10} R$) 及び Kubelka-Munk (K-M) 関数 ($K = (1 - R)^2 / 2R$) を計算して、この値と目的物質の既知の濃度の関係をグラフ (検量線) とし、未知試料中の濃度を求めた。

反射吸光度は低濃度領域で直線性を有していて、高濃度領域には適用できない。一方、K-M 関数は低濃度領域では直線性がなく、反射吸光度よりも高濃度領域まで直線性がある。そのため、目的物質の濃度に応じて双方を使い分けた。

(2) 食塩中フェロシアン化物定量法の開発

フェロシアン化物の定量には、公定法として使用されているプルシアブルー法に準拠した方法を用いた。公定法では硫酸鉄 (II) イオンとフェロシアン化物を反応させ、生じたプルシアブルー溶液の吸光度を測定する。本研究においては、プルシアブルー溶液をろ過して市販の 25 mm 径、0.45 μm 孔径のメンブレンフィルター上に捕集し、635 nm (赤色) における反射吸光度及び K-M 関数の値で検量線を作成して、定量性能を評価した。また、市販食塩にフェロシアン化物を添加して回収率を求めた。

(3) 市販目視定量分析キットと組み合わせた重金属分析の開発

市販の目視分析キットとして市販されているパックテストズーム (共立理化学研究所製) と開発した反射型吸光度検出器を組み合わせて、銅、マンガ、クロムを定量した。キットは発色試薬等が入ったプラスチック製チューブと、発色した物質を捕集するためのフィルターチップ、送液のためのシリンジ、シリンジとチップを結合する

ホルダー等からなる。キット本来の使い方では、チューブ内に試料水を吸い上げて反応、発色させ、それをシリンジ内に吸い上げてフィルターチップで捕集する。フィルターの着色度合を、色見本と比較することで濃度を判定する。本法では、試料を捕集したフィルターを反射吸光度検出器に取り付けて、それぞれの目的物質に適した波長で反射吸光度及び K-M 関数を測定した。

銅(II)の測定キットはキレート試薬としてバクソプロインを使用しており、反応すると橙色に発色する。測定波長は 430 nm とした。

マンガンの測定キットは酸化反応により過マンガン酸イオンとして赤紫色に発色する。515 nm で測定した。

クロム(VI)のキットはキレート試薬としてジフェニルカルバジドを使用しており、反応すると紫色に発色するので、マンガンと同じ 515 nm で測定した。

キットに付属するフィルターチップ、シリンジ、及びそれらを連結するためのアダプターの外観を図 1 に示す。



図 1 市販目視分析キットに付属するフィルターチップ、シリンジ、アダプターの外観

(4) 天然水中リンの高感度定量法の開発

リンはモリブデン酸アンモニウムと反応させてモリブドリン酸を生成し、これをフィルターに捕集して測定した。JIS に定められた方法では、生成したモリブドリン酸をアスコルビン酸により還元してリン-モリブデンブルー（青色）とし、880 nm における吸光度を測定している。本研究では、同様に生成したモリブデンブルーを市販のメンブレンフィルターに捕集して 740 nm で測定する方法と(3)に示したパケットズーム用フィルターチップに捕集して測定する方法を検討した。

さらに、アスコルビン酸で還元するのではなく、陽イオン性の色素であるマラカイトグリーンとイオン対を形成し、これをフィルターチップに捕集して緑色のイオン会合体の反射吸光度及び K-M 関数を 620 nm で測定する方法についても検討した。

(5) リン定量自動化装置の開発

(4)におけるメチレンブルー法による定量において、試料と反応溶液（硫酸、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、アミド硫酸アンモニウム、アスコルビン酸）をそれぞれソレノイドポンプで一定量を送液し、採取を自動化する方法を検討し、精度等を検討した。

4. 研究成果

(1) 反射型吸光度検出器の試作

試作した検出器（市販フィルターの反射吸光度を 8 波長で測定可能）のブロック図を図 2 に、外観を図 3 に示す。装置は全体を制御する回路や測定結果を表示する部分を含む制御ユニット部と、フィルターに保持した試料に光を照射し、その反射光を検出するセンサーヘッド部からなる。光源にはそれぞれの波長に対応した LED を用い、順次点灯させた。LED の発光は光ファイバーで試料を保持したフィルターに導き、試料で反射された光を光源光及び試料表面に対して 45 度方向に設置した検出器、フォトダイオードで検出した。装置全体が手の平に載る程度の大きさで、電池（9 V）あるいは AC アダプターにより駆動できる。

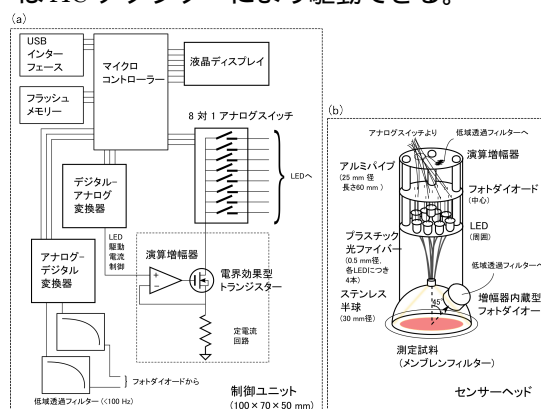


図 2 市販フィルター測定用吸光度検出器のブロック図

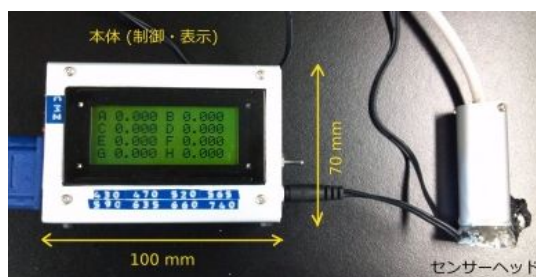


図 3 市販フィルター測定用吸光度検出器の外観

一方、パケットズーム専用のフィルターチップに対応した検出器は、より小面積の測定に対応できるように測定波長を 4 波長にし、センサーヘッド部もチップに対応できるように改良した。フォトダイオードを 45 度方向に設置できないため、LED 用とは別に光ファイバーを設け、反射光をヘッド内のフォトダイオードに導くようにした。制御ユニットの回路は 8 波長のものと同様である。ブロック図を図 4 に示す。

(2) 食塩中フェロシアン化物定量法の開発

生成したプルシアンブルーの測定波長について、590, 635, 660, 740 nm の 4 波長から検討したところ、635 nm が直線範囲、

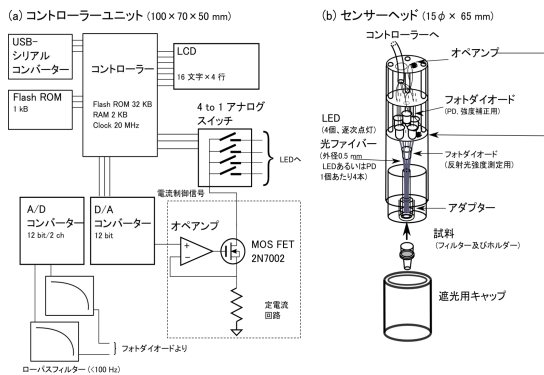


図 4 フィルターチップ測定用吸光度検出器のブロック図

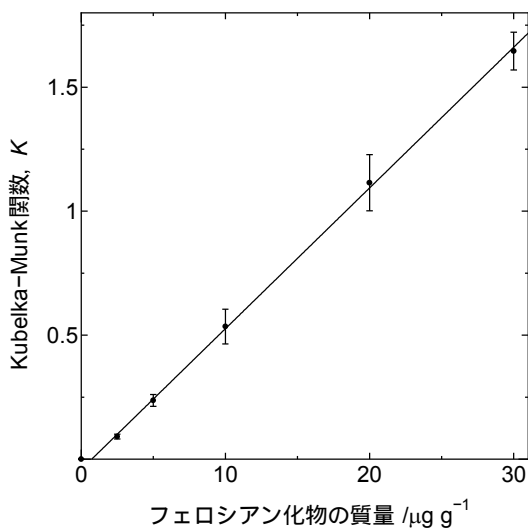


図 5 フェロシアン化物の検量線 (K-M 関数, 635 nm)

感度ともに優れていたため、これを用いた。また反射吸光度と K-M 関数双方の検量線を作成したが、前者は低濃度まで測定できるものの、フェロシアン化物イオンの質量として数 μg に達すると検量線が曲がる傾向が見られた。一方、後者の感度は劣るものの $2.5\sim 30 \mu\text{g}$ の範囲で良好な直線が得られた。これを図 5 に示す。

K-M 関数は高濃度領域で直線性が成立し、原点を通らないため、 $2.5 \mu\text{g}$ 定量時の標準偏差 ($n = 5$) の 3 倍から検出限界を求めたところ、 $0.6 \mu\text{g}$ となった。試料である食塩の採取量を 2g とすると、 $0.3 \mu\text{g/g}$ である。食品衛生法では基準値がフェロシアン化ナトリウムとして $20 \mu\text{g/g}$ と定められており、これはフェロシアン化物イオンとして $14 \mu\text{g/g}$ 、試料 2g の場合には $28 \mu\text{g}$ に相当する。そのため、K-M 関数を用いることで基準値よりも低い濃度から十分に測定できる感度を有していた。

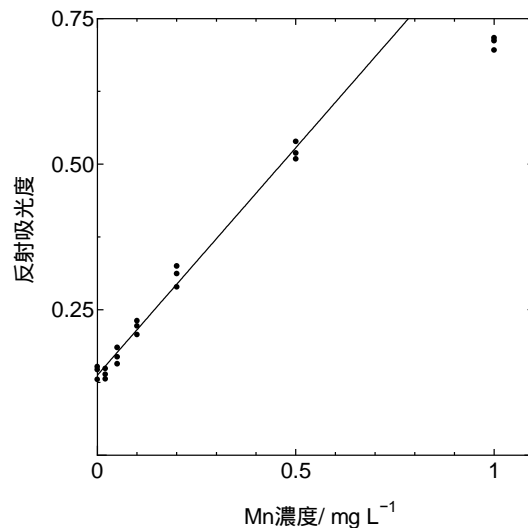
実際にフェロシアン化物が添加された食塩を入手することができなかつたため、フェロシアン化物濃度として 1.25 及び $10 \mu\text{g/g}$ となるように添加した食塩を分析して

定量値を求めたところ、回収率はそれぞれ $113\pm 5\%$ 、 $96\pm 9\%$ ($n = 5$) であった。低濃度の場合過大に濃度を見積もっているが、スクリーニング分析には十分な性能を有していた。

(3) 市販目視定量分析キットと組み合わせた重金属分析の開発

マンガン、銅、クロムいずれの金属についても、色見本で示された濃度範囲全域について、検量線を作成することができた。ただし、反射吸光度のみあるいは K-M 関数のみでカバーすることは困難で、低濃度領域では反射吸光度、高濃度では K-M 関数を使う必要があった。一例として、図 6 に 515nm で測定したマンガンの検量線 (反射吸光度及び K-M 関数) を示す。

(a) 反射吸光度



(b) K-M関数

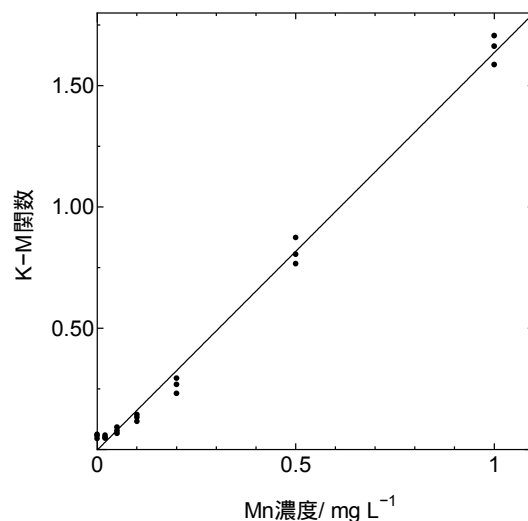


図 6 マンガンの検量線 (515nm)

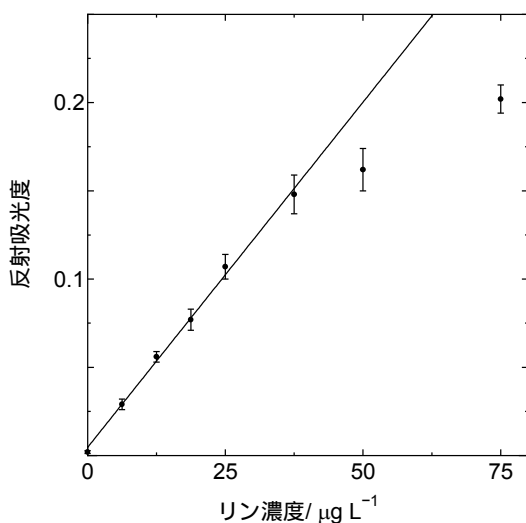
検出限界は $50 \mu\text{g/L}$ であり、甲府市内を流れる濁川水試料中のマンガンを定量したところ $75\pm 7 \mu\text{g/L}$ ($n = 3$) となり、これは誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-OES) で得

られた 84 $\mu\text{g/L}$ と比較的好く一致した。クロム及び銅については、それぞれ検出限界が 2.0 $\mu\text{g/L}$ 及び 20 $\mu\text{g/L}$ となり、比較的高感度ではあるが、実際の河川水試料を分析するには感度が不足していた。そこで、銅を 100 $\mu\text{g/L}$ となるように河川水試料に添加して測定したところ、回収率は 98~102% となり、良好な定量性能を有していることがわかった。

(4) 天然水中リンの高感度定量法の開発

まず JIS に準拠した、リン-モリブデンブルー法により、25 mm 径の市販フィルターを用いた場合と、より小型のフィルターチップを利用した場合で定量性能を比較した。得られた検量線を図 7 に示す。

(a) 25 mm 径フィルターを使用



(b) フィルターチップを使用

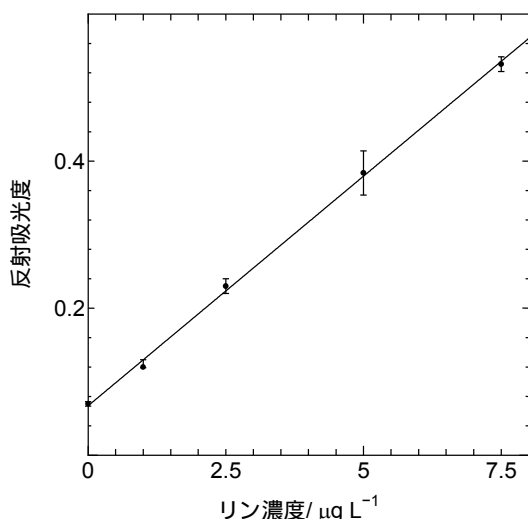


図 7 モリブデンブルー法によるリンの検量線 (740 nm)

検量線からも明らかな通り、フィルターチップを用いることで大幅な高感度化が達成できている。これは、フィルターチップで

はる過面積が小さい (直径約 7 mm) のため、濃縮倍率が大きくなるからである。検出限界で比較すると、前者は 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、後者は 0.2 $\mu\text{g/L}$ であり、5 倍の高感度化を達成できている。後者の装置、検量線を用いて甲府市内の河川水中のリンを定量したところ 25~67 $\mu\text{g/L}$ となり、公定法である JIS 法によって得られた 25~75 $\mu\text{g/L}$ と 10% 程度以内の誤差で一致した。本法は高感度であるため、10~20 倍希釈して測定した。実際にはより低濃度の試料でも分析できる。

さらに、モリブデンブルーを生成するのではなく、モリブドリン酸をマラカイトグリーンと反応させて会合体を形成し、これをろ過して 620 nm における反射吸光度を測定する方法についても検討した。得られた検量線を図 8 に示す。

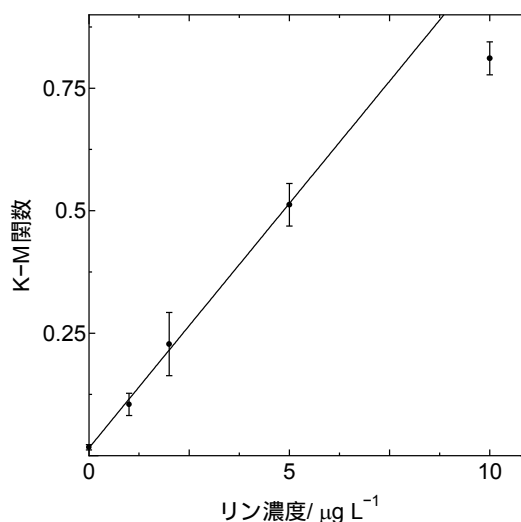


図 8 マラカイトグリーン会合体法によるリンの検量線 (K-M 関数, 620 nm)

モリブデンブルーと比較すると、マラカイトグリーン会合体はモル吸光係数が高いことが知られている。そのため、感度の向上が期待されたが、実際には反射吸光度では直線的な検量線が得られず (ここには示していない)、K-M 関数のみ直線となった。これは、ブランク値 (リンを含まない試料を、他の試料と同様な操作で測定した空試験値) が吸光度として 0.08 と高く、これにより直線範囲部分が狭くなってしまったものと考えられる。K-M 関数から求めた検出限界はモリブデンブルー法とほぼ同等な 0.2 $\mu\text{g/L}$ に達していることから、試薬濃度などの条件を検討することにより、さらなる高感度化が可能と考える。

(5) リン定量自動化装置の開発

ソレノイドを利用したポンプは、駆動パルスあたりの吐出量を調節できるので、これを 50 μL として、試料 (河川水等) 4 mL、混合試薬溶液 0.35 mL をそれぞれ別のソレノイドポンプで送液し、混合したのち(4)と同様にろ過して定量した。測定精度は手動

で調製した場合と同様に，相対標準偏差10%程度と良好な結果が得られた。現時点では，試料溶液と吐出先（それぞれの溶液を入れる反応容器）の切り替えは手で行っているため，今後実用化のためには，自動的に交換できるような仕組みの開発が必要である。まずは試料採取部分の自動化を検討している。

鈴木 保任 (SUZUKI, Yasutada)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号：20262644

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yasutada Suzuki, Masaru Ishigaki, Koji Oshita, Takeshi Yamane, Susumu Kawakubo, Development of a Portable LED-Based 8-Channel Reflective Colorimeter and Its Application to Simple Determination of Hexacyanoferrate (II) in Common Salts, 日本海水学会誌, 査読有, 第67巻,2013, pp.47-51

〔学会発表〕(計5件)

鈴木保任, 山根兵, 本水昌二, 川久保進, モリブドリン酸 - マラカイトグリーン会合体のフィルター捕集と可搬型反射比色計を用いる天然水中リンの高感度定量法の開発, 2015.05.24, 山梨大学甲府キャンパス (山梨県甲府市)

Yasutada Suzuki, Susumu Kawakubo, Development of 4-channel LED-based reflective photometer for determination of trace elements in river water samples with membrane filter extraction, PITTCON 2015, 2015.3.10, New Orleans (United States)

鈴木保任, 佐藤直広, 山根兵, 川久保進, 4波長測定可能な反射型比色計の開発と天然水中の銅及びリンのフィルター濃縮・定量への応用, 第74回日本分析化学会討論会, 2014.05.25, 日本大学工学部 (福島県郡山市)

佐藤直広, 鈴木保任, 山根兵, 川久保進, 市販のフィルター濃縮目視分析法に対応したLEDを光源とする簡易な反射型比色計の開発, 日本分析化学会第62年会, 2013.09.10, 近畿大学東大阪キャンパス (大阪府東大阪市)

鈴木保任, 石垣優, 山根兵, 川久保進, LEDを光源とする簡易な反射型比色計の開発と食塩中のフェロシアン化物及び天然水中のリンの定量への応用, 日本海水学会第60年会, 2013.06.06, 山梨県立図書館 (山梨県甲府市)

〔その他〕

ホームページ等

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DisplInfo.Scholar?ID=18B90CAF533A59C6

6．研究組織

(1)研究代表者