

食塩および海水中の臭素酸や塩素酸などのハロゲン酸の簡便・迅速な 高感度定量法の開発

鈴木 保任¹, 山根 兵²

¹山梨大学生命環境学部, ²山梨大学教育人間科学部

概要 【背景】 臭素酸イオン(BrO_3^-)や塩素酸イオン(ClO_3^-)は、発癌性が強く疑われる物質であり、水道原水や海水を塩素系薬剤を用いて消毒・殺菌する際や、食塩溶液の電解処理などで副生する可能性があることから、水質基準に関する省令においては、臭素酸イオン濃度 0.01 mg L^{-1} 以下、また、塩素酸濃度 0.6 mg L^{-1} 以下が規定されている。これらの物質の簡便、迅速、高感度な分析法が望まれていることから、紫外線発光ダイオード(UV LED)を励起光源とする小型で簡便な蛍光検出器を試作、評価したのち、チアミンとハロゲン酸の反応により蛍光性物質を生成する高感度な反応と組み合わせるフロー分析システムを構築することにより、ハロゲン酸の定量が可能か検討した。

【蛍光検出器の試作と評価】 市販の UV LED を光源とし、小型の光電子増倍管を検出器とする蛍光検出器を試作した。大きさは $150 \times 110 \times 65 \text{ mm}$ と小型でありながら、蛍光物質であるリグニンスルホン酸ナトリウム溶液の検量線を作成したところ、相関係数 0.9999 、 10 mg L^{-1} 測定時の相対標準偏差が 2% 以下と良好な性能を有していた。

【フローシステムの構築と測定条件の検討】 水をキャリアーとし、チアミン及び反応促進剤であるバナジン酸アンモニウムを試薬溶液として用いるフローシステムを構築し、検出器に試作した蛍光検出器を取り付け、各種条件の最適化を検討した。励起及び蛍光のそれぞれの波長は、 360 nm 及び 420 nm が最適であった。励起光照射及び蛍光取り出しのための光学系の改良、体積が小さく分散の影響の小さいフローセルへ変更など、その他の検出器の改良は、感度の向上にはあまり影響がなかった。一方、フローシステム内の混合及び反応コイルの温度は 70°C が最適であった。

【臭素酸の定量性能】 最適化した条件下で臭素酸を測定したところ、 0.20 mg L^{-1} レベルまでピークを観測することができ、 1.0 mg L^{-1} であれば精度よく測定できることがわかった。しかしながら、フローシグナルには大きな雑音が乗っており、検出限界は 0.10 mg L^{-1} と規制レベルの定量には感度が不足していた。そこで、移動平均によりフローシグナルの平滑化を試みたところ、さらなる感度向上は必要であるものの検出限界が 0.031 mg L^{-1} まで改善された。今後は蛍光検出器の性能向上を図るとともに、フローシステムの小型化、実際試料の分析を進めていく。

1. 研究目的

臭素酸イオン(BrO_3^-)や塩素酸イオン(ClO_3^-)は、発癌性が強く疑われる毒性の強い物質であり、水道原水や海水を塩素系薬剤により消毒・殺菌する際や、食塩溶液の電解処理などで副生する可能性がある。水道法第4条に基づく水質基準に関する省令¹⁾においては、臭素酸イオン濃度 0.01 mg L^{-1} 以下、また塩素酸濃度 0.6 mg L^{-1} 以下が規定されている。これらの物質の定量はイオンクロマトグラフ法に基づく方法が公定法として採用されている²⁾。イ

オンクロマトグラフは様々な物質の定量に利用できるものの、必ずしも安価ではなく、また、臭素酸の定量では選択性や感度の向上のためにポストカラム反応装置と吸光度検出器が別途必要である。そのため、これらの物質の迅速、簡便で、高感度な分析法が望まれており、キャピラリー電気泳動法³⁾や吸光光度法⁴⁾の報告がある。また、簡便な操作と高感度を両立させるために、新規高感度検出反応の開発とそれらを導入した流れ分析システム^{5,6)}や長光路吸収セルを組み合わせた流れ分析法の報告もある

7)。

本研究では、簡便で高感度な蛍光検出器の試作及び試作した検出器と高感度な反応系による検出及び測定を一体化した、より簡便で小型、汎用性の高いハロゲン酸定量のための流れシステムの開発を目的とした。可搬型の装置の開発を目指すため、蛍光検出器は小型でありながら高効率、高出力の紫外線発光ダイオード(UV LED)を励起光源に使い、光検出器にも高感度で小型の光電子増倍管モジュール(PMT)を使用して試作した。また、検出反応には、ハロゲン酸がチアミン(ビタミン B₁)を酸化し、蛍光性物質を生じる反応⁶⁾を利用し、条件の最適化を試みた。

2. 研究方法

2.1 試薬

試薬は特に断わらない限り和光純薬製特級試薬を用い、溶液の調製には水道水をイオン交換して脱イオンしたのちミリポア製 Milli-Q II で精製した水を用いた。

蛍光検出器の評価のためのリグニンスルホン酸ナトリウム溶液は、東京化成工業株式会社製リグニンスルホン酸ナトリウムを水に溶解して 0~100 mg L⁻¹ の溶液とした。

ハロゲン酸の定量のための各試薬溶液は、既報⁶⁾に従い次のように調製した。

臭素酸イオン(BrO₃⁻)標準溶液(1,000 mg L⁻¹)は関東化学(株)製臭素酸カリウム 0.261 g を水に溶かし、全量を 200 mL とした。実験に用いたより希薄な標準溶液は、これ

を適宜希釈して用いた。

チアミン溶液(0.20 mol L⁻¹)は、チアミン塩酸塩 1.67 g を水に溶かし、全量を 200 mL とした。さらにこれを 10 倍に希釈したものを R1 溶液(2×10⁻² mol L⁻¹チアミン溶液)として実験に用いた。

バナジン酸アンモニウム溶液(1×10⁻² mol L⁻¹)は、関東化学(株)製バナジン(V)酸アンモニウム 0.29 g を水に溶かして全量を 250 mL とした。さらにこれを 100 倍に希釈したものを R2 溶液(2×10⁻⁴ mol L⁻¹バナジン酸アンモニウム溶液)として実験に用いた。

2.2 蛍光検出器の試作と評価

試作した蛍光検出器のブロック図を Fig. 1 に、内外の写真をも Fig. 2 に示す。本装置の励起光源には、低消費電力で発光線幅の狭い、発光ダイオード(LED)を用いた。評価段階においては UV LED、NSPU510CS(日亜化学、発光波長 375 nm, 出力 5 mW)を用い、ハロゲン酸測定時には紫外線 LED、OSV5YL3131A(OptoSupply, 波長 405 nm, 出力 5 mW)または XSL-355-5E(Roithner Laser Technik, 波長 360 nm, 出力 1 mW)を用いた。蛍光検出においては、励起光が検出器に到達すると雑音となり、感度が低下する。そのため、不要な波長領域の発光をカットする目的で、LED と試料セルの間に可視光カットフィルター(試作時に使用, CVI Laser, SPF-400-12.5MM, カットオフ波長 400 nm)あるいはバンドパスフィルター(定量時に使用, Edmund Optics, 65618, 405 nm ±10 nm あるいは同 67760, 360 ±10 nm)を入れた。セル内の試料が生じた蛍

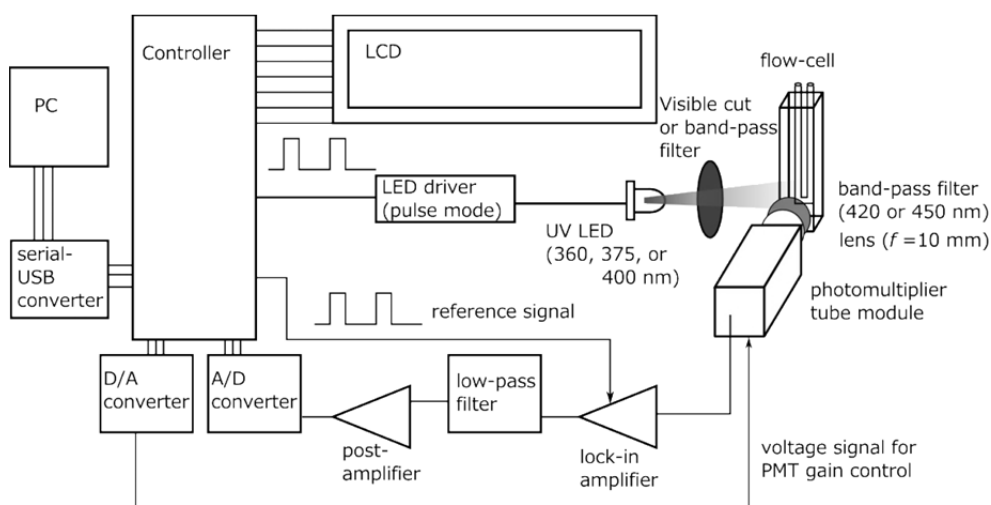


Fig. 1. Block diagram of the fluorometric detector using an ultraviolet LED as a light source

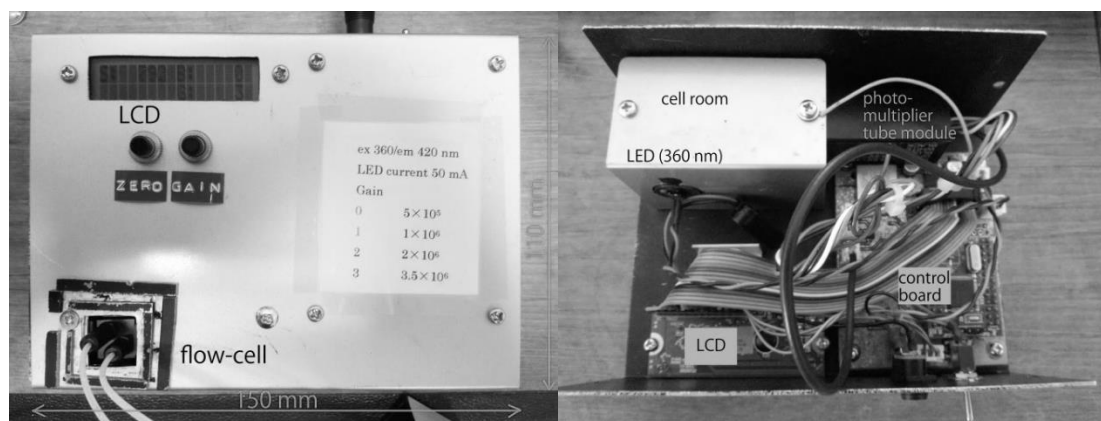


Fig. 2. Outside and inside photograph of the fluorometric detector. Its dimensions are 150×110×65 mm.

光は、評価時には 450 nm のみを取り出すためのバンドパスフィルター (Edmund Optics, 65625, 450±10 nm)、定量時には 420 nm のバンドパスフィルター (Edmund Optics, 65621, 420±10 nm) を通じて、焦点距離 10 mm のレンズで集光した後、光電子増倍管モジュール (PMT, 浜松ホトニクス, H10722-110) により検出した。

コントローラー (ルネサス H8-3694F, ROM 32 kB, RAM 2 kB, Clock 20 MHz) が、検出器全体を制御する。LED は周波数 320 Hz のパルス点灯とした。このパルス信号を参照信号としてロックインアンプ (Analog Devices, AD630) に送り、PMT により検出された信号の内、このパルスに同期した信号のみを取り出すことで、S/N 比の向上を図った。ローパスフィルター、ポストアンプ (いずれも Linear Technology 製オペアンプ LT1114 を用いて作成) を通じて増幅した後、A/D コンバーター (Analog Devices, AD7898) を通じてコントローラーに取り込んだ。PMT は外部から制御電圧を与えることで増幅率を変化させられるため、コントローラーから D/A コンバーター (Texas Instruments, DAC 7571) を用いて制御電圧を発生した。本体のスイッチを押すことで、 $5 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^6$ 倍まで増幅率を変化できるようにした。得られた蛍光強度は、ブランク時のバックグラウンド強度を差し引いて液晶ディスプレイに表示するとともに、シリアル-USB 変換 IC (FTDI, FT232RL) を通じて外部の PC に送信し、VisualBasic6 により作成したプログラムでフローシグナルを表示、保存できるようにした。

この装置の性能の評価は、リグニンスルホン酸ナトリウム溶液の検量線を作成することにより行った。セルには、光路長 10 mm の四面透明の石英セルを用いた。

2. 2 フローシステム

既報⁶⁾を参考に試作したフローシステムの概略図を Fig. 3 に示す。キャリアー (C) および試薬溶液 (R1, R2) の送液には、サヌキ工業製 RX5020T 型、および RX5010T 型ポンプをそれぞれ用いた。流路を構成する配管およびチューブを接続するジョイント部分はすべてポリテトラフルオロエチレン (PTFE) もしくはポリエーテルエーテルケトン (PEEK) 製で、混合コイル (MC) 及び反応コイル (RC) は直径 2 cm 程度の紙筒に PTFE チューブを巻きつけたものを用いた。MC および RC は東ソー製 CO-8000 型恒温槽内に入れて定温に保持した。キャリアーには水を使用し、流速は 0.3 mL min^{-1} とした。サンプルループ付きのバルブから試料をキャリアーの流れに注入した。一方、反応試薬の $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ チアミン溶液と反応促進剤である $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ バナジン酸アンモニウム溶液は別のポンプで送液し、混合コイル中で混合した。下流においてキャリアーと合流し、反応コイル内で試料と反応試薬を混合、反応させて、蛍光性物質を生成した。反応速度を向上するため、混合コイル、反応コイルは恒温槽内に置き、50～70°C で加温した。ただし、反応コイルからの溶液が蛍光検出器に入る前に、水浴中に浸漬した冷却コイル (内径 0.5 mm, 外径 2 mm, 長さ 1.5 m) 内を通過するようにした。蛍光生成物をフローセルに導き、試作した蛍光検出器により検出した。当初は励起波長 (LED の発光波長) と検出波長 (バンドパスフィルターの中心波長) を既報⁶⁾に従い、それぞれ 400 nm、450 nm としていたが、最適化に伴い 360 nm、420 nm に変更した。また、フローセルは FLFM 200-B-2 (ジーエルサイエンス, 光路 2×10 mm, 容量 0.25

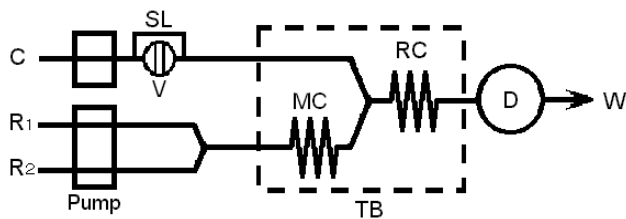


Fig. 3. Schematic diagram of flow system for the determination of halogen acid. C: carrier, R1: thiamin solution, R2: ammonium vanadate solution, SL: sample loop, V: injection valve, MC: mixing coil, RC: reaction coil, TB: thermostatic bath, D: fluorometric detector (λ_{ex} : 360 nm, λ_{em} : 420 nm), W: waste.

mL)または 583.3-F/Q/3/Z15 (Starna, 光路 3×11 mm, 容量 0.1 mL)を用いた。

3. 結果および考察

3.1 試作した蛍光検出器の評価

光源に 375 nm の LED、不要な発光のカットに 400 nm 以下を透過する可視光カットフィルターを用いた装置により、 $0 \sim 50 \text{ mg L}^{-1}$ の範囲で得られたリグニンスルホン酸ナトリウム溶液の検量線を **Fig. 4** に示す。PMT の増幅率は 5×10^5 とした。A/D コンバーターの分解能が 12 bit ($0 \sim 4095$) であるため、蛍光強度の最大値は 4095 となる。 100 mg/L の溶液を測定した際に、この範囲を超えたため示していない。直線性は相関係数の二乗として 0.9999 と非常に良好であり、また測定精度も 10 mg L^{-1} 溶液を 5 回測定した際の相対標準偏差が 2% 以下と良好であった。したがって、この蛍光検出器は良好な定量性能を有していると判断した。

3.2 臭素酸イオンの定量条件の最適化

試作した検出器は、通常の蛍光光度計としては十分な性能を有していたため、フローシステムに組み込み、検出条件を検討した。検出器の増幅率は、いずれも最大の 3.5×10^6 にて測定した。

まず、励起及び検出波長を検討した。既報に近い波長として、波長 405 nm の LED を光源に使い、450 nm における蛍光を検出したところ、かなり高濃度の臭素酸を導入しても、ピークを得ることができなかった。詳細は不明であるが、市販蛍光検出器の光源とスペクトル特性などの違いが影響しているのかもしれない。そこで、より短波長を出力

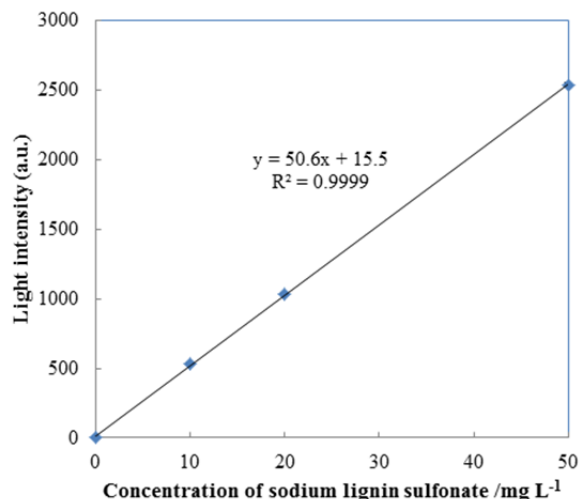


Fig. 4. Calibration curve of sodium lignin sulfonate solution. Error bars are omitted because they are within markers.

する 360 nm の LED に変更したところ、臭素酸のピークが得られるようになった。さらに、検出波長についても短波長側の 420 nm とすることにより、若干ではあるがピーク高の増強が見られた。今回試作した検出器では、励起波長、検出波長のいずれも、LED やバンドパスフィルターを交換しないと変更が不可能である。市販の蛍光検出器を用いて、再度最適な励起・検出波長を調べる必要があると考える。

続いて、フローセルでは通常の角型セルと比較して励起光を受ける試料の体積が小さくなることから、光学系の改良を試みた。具体的には、検出側だけでなく、LED 側にも集光用のレンズを取り付け、より狭い範囲に励起光が集中するようにした。しかしながら、これは感度の向上にはつながらなかった。LED が元々狭照射角タイプ (15°) であること、製作精度の問題でセルの試料窓に適切に光が届いていなかったこと、などが原因として考えられる。一方、フローセル内の容積が大きいと、生成した蛍光性物質が拡散してピーク高が低くなる。そこで、試料室の体積が 0.25 mL のものから 0.1 mL に変更して感度への影響を検討した。こちらも、試料室が小さくなることから励起光の照射領域が小さくなること、生じる蛍光強度も小さくなることから、大きな効果は得られなかった。さらに、蛍光強度は励起光源の強度に比例することから、LED の駆動電流を定格の 50 mA まで上げることで感度が向上するかを検討

した。この場合は蛍光強度とともにバックグラウンドレベルも上昇するため、結果的に感度の向上には結び付かなかった。

最後に、反応温度の最適化を試みた。恒温槽温度を50~70°Cに変化させると、感度の上昇が見られた。しかしこれ以上にすると気泡の発生により、フローシグナルにノイズが見られるようになったため、70°Cを上限とした。

3.3 臭素酸イオンのフローシグナルと定量性能

最適化した条件にて得られた臭素酸のフローシグナルを Fig. 5 に示す。0.20 mg L⁻¹レベルのピークを確認でき、1.0 mg L⁻¹では再現性が良好なことも確認できる。ベースラインのうち、0~150 sの信号強度の標準偏差(σ)を求めたところ、10.7であった。3 σ を検出限界とするとピーク高として32.1となる。1.0 mg L⁻¹のピーク高がそれぞれ320、335であったことから、検出限界は0.10 mg L⁻¹となり、このままでは規制値レベルの測定は困難であることがわかった。ベースラインに見られるノイズが単純でランダムなものであるため、移動平均による平滑化⁸⁾を試みた。平均化点数は、測定点の前後4点ずつ(計9点)として、ノイズ除去の効果を検討した。Fig. 5のデータに対して平滑化処理した結果を Fig. 6 に示す。ノイズレベルが大きく低下したことがわかる。0~150 sにおける σ の値は3.29に低下したため、検出限界となるピーク高は10である。移動平均の影響で1.0 mg L⁻¹のピーク高も310、330と若干低下したが、検出限界は0.031 mg L⁻¹まで改善された。なお、平均化点数を増加するとベースラインのノイズの標準偏差はさらに減少するものの、ピークの高さも減少するため検出限界

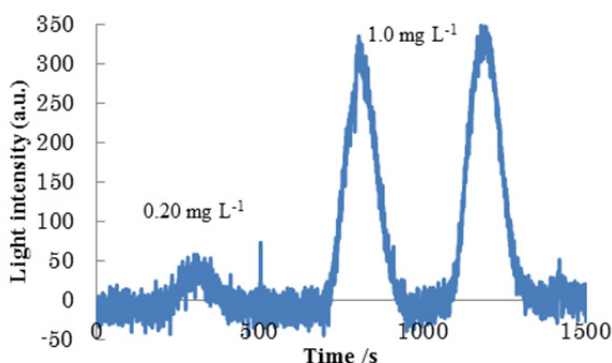


Fig. 5. Flow signal of bromate (0.20 and 1.0 mg L⁻¹) obtained under optimized conditions. A sharp peak at ca. 500 s is noise caused by a bubble.

の向上にはつながらなかった。環境基準の0.01 mg L⁻¹をクリアするにはさらなる感度向上が必要であるが、装置の改良と前述のようなノイズ除去の工夫を加えることにより、実用に足る性能が得られるものと考えられる。

4. 今後の課題

本研究で開発した小型蛍光検出器の基本性能を、発蛍光性であるフミン物質を用いて検討したところ小型で、持ち運び可能であるのにも関わらず、良好な定量精度と感度を有していることが確認された。LED やバンドパスフィルターの変更が必要であるものの、様々な励起/検出波長の組み合わせを利用できるため、種々の分析対象への応用が期待できる。

一方で、フロー系に適用した場合には、本研究で対象としているハロゲン酸の検出定量には感度が不足していた。そのため、先に示したように、励起用LED側にも集光系を設け、励起光を試料ゾーンに集中的に照射できるようにするとともに、蛍光の検出側のレンズも大口径化するなどして、生じた蛍光をより多く取り込む改良を進めることで、さらなる高感度化を図る。

また、当初はポンプなどのフローシステム全体を可搬化する計画であったが、本研究の期間中には検討できなかった。検出器の改良後に、電池で駆動できる小型の市販ポンプ等を利用し、フローシステムについても小型化と電池駆動を実現する。反応コイルを加温するヒーターについても、ペルチェ素子あるいはハロゲンランプなどを熱源として利用する、小型の加熱ユニットの設計、試作を予定し

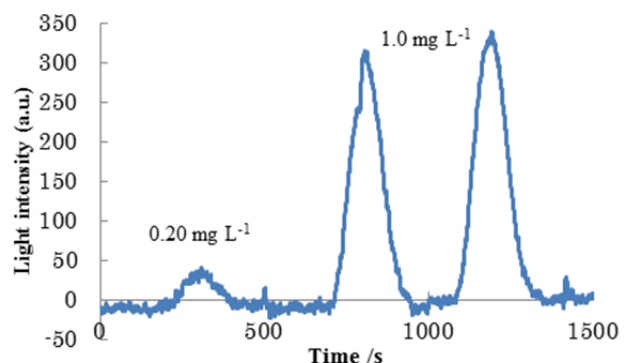


Fig. 6. Flow signal of bromate (0.20 and 1.0 mg L⁻¹) after moving average processing of Fig. 5 ($n=9$)

ている。

これら全体の試作、統合、最適化等を終えた上で、水道水のような単純なマトリクスを試料の分析に応用し、最終的には食塩のような高濃度のマトリクスが共存する試料の分析を試みる。また、臭素酸のみならず、塩素酸やヨウ素酸を対象とした定量及びそれぞれの分離定量法の開発も進める。

参考文献

- 1) 厚生労働省令 101 号「水質基準に関する省令」平成 15 年 5 月 30 日, 平成 23 年 1 月 28 日最終改正.
- 2) 厚生労働省告示 261 号「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」, 平成 15 年 7

月 22 日, 平成 24 年 3 月 30 日最終改正.

- 3) T. Takayanagi, M. Ishida, J. Mbuna, R. Driouich and S. Motomizu, *J. Chromatogr. A.*, **1128**, 298-302 (2006).
- 4) L. Romele and M. Achilli, *Analyst*, **123**, 291-294 (1998).
- 5) 伊澤美紀, 山根兵, *分析化学*, **56**, 745-750 (2007).
- 6) 伊澤美紀, 山根兵, 第 67 回分析化学討論会講演要旨集, P1032, p. 154 (2006).
- 7) I. V. Tóth, I. C. Santos, C. F. M. Azevedo, J. F. S. Fernandes, R. N. M. J. Páscoa, R. B. R. Mesquita and A. O. S. S. Rangel, *Anal. Sci.*, **29**, 563-570 (2013).
- 8) Y. Suzuki, H. Hori, M. Iwatsuki and T. Yamane, *Anal. Sci.*, **19**, 1025-1028 (2003).

Development of Simple, Rapid and Highly Sensitive Determination Method of Halogen Acid such as Bromate and Chlorate

Yasutada Suzuki and Takeshi Yamane

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Yamanashi
Faculty of Education and Human Sciences, University of Yamanashi

Summary

Bromate and chlorate are carcinogenic substances produced as by-products of disinfection process in drinking water or electrolysis of common salt solution. Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare have regulated their maximum contaminant level in drinking water as 0.01 mg L^{-1} and 0.6 mg L^{-1} , respectively. In this study, we have developed a small fluorometric detector using an ultraviolet light-emitting diode (UV LED) as an excitation light source and its analytical performances were evaluated. It was then combined with a flow system for the fluorometric determination of halogen acids which contained the oxidation reaction of thiamin (vitamin B₁) with the assistance of ammonium vanadate, and the equipment and reaction condition were optimized in order to develop simple, rapid highly sensitive determination method of halogen acids.

The developed detector is compact and its dimensions are $150 \times 110 \times 65 \text{ mm}$. Calibration curve for solution of sodium lignin sulfonate which is fluorescent substance was built in order to verify the analytical performance of the detector. As a result, its correlation coefficient r is 0.9999 and the relative standard deviation of fluorescent light intensity at 10 mg L^{-1} is less than 2%, thus its good analytical performance was confirmed.

It was used as a detector for the flow system of halogen acids determination and several conditions were optimized. Optimum wavelength for the excitation and fluorescence detection was 360 nm and 420 nm, respectively. On the other hands, improvement of optical system, the volume of a flow-cell which would affect the dispersion of sample zone, and so on, did not markedly change the sensitivity. Optimum temperature for a mixing and reaction coil was 70°C .

Under the optimized conditions, a peak for the bromate at 0.20 mg L^{-1} level could be identified, and 1 mg L^{-1} bromate could be determined with a good reproducibility. The limit of detection (LOD), however, was 0.10 mg L^{-1} due to the noisy flow signal. The sensitivity was improved to 0.031 mg L^{-1} by using moving average process for the signal. Further improvement of the detector, development of portable flow system, and the application to real samples will be studied in the future.