

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-132787

(P2019-132787A)

(43) 公開日 令和1年8月8日(2019.8.8)

| (51) Int.Cl. | | | F I | | | テーマコード (参考) | | |
|--------------|-------|-----------|--------|-------|---|-------------|--|--|
| GO 1 N | 31/02 | (2006.01) | GO 1 N | 31/02 | | 2 G O 4 2 | | |
| GO 1 N | 21/78 | (2006.01) | GO 1 N | 21/78 | Z | 2 G O 5 4 | | |
| BO 1 J | 20/10 | (2006.01) | BO 1 J | 20/10 | D | 4 G O 6 6 | | |
| BO 1 J | 20/28 | (2006.01) | BO 1 J | 20/28 | Z | | | |

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2018-16946 (P2018-16946)
 (22) 出願日 平成30年2月2日 (2018.2.2)

(71) 出願人 305060567
 国立大学法人富山大学
 富山県富山市五福3190
 (74) 代理人 100114074
 弁理士 大谷 嘉一
 (72) 発明者 倉光 英樹
 富山県富山市五福3190 国立大学法人
 富山大学内
 (72) 発明者 田口 茂
 富山県富山市五福3190 国立大学法人
 富山大学内
 (72) 発明者 岡崎 琢也
 富山県富山市五福3190 国立大学法人
 富山大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 簡易呈色分析方法及びそれに用いる分析具

(57) 【要約】

【課題】 有色成分を簡便に濃縮でき、少量の試料で高感度に測定できる簡易呈色分析方法の提供を目的とする。

【解決手段】 分析の対象となる溶液に、発色剤と、沈降性又は浮上性の選択性吸着剤とを、同時に又は順次加えることを特徴とする。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

分析の対象となる溶液に、発色剤と、沈降性又は浮上性の選択性吸着剤とを、同時に又は順次加えることを特徴とする簡易呈色分析方法。

【請求項 2】

前記選択性吸着剤は、微粒子からなることを特徴とする請求項 1 記載の簡易呈色分析方法。

【請求項 3】

前記選択性吸着剤は、シリカゲルからなることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の簡易呈色分析方法。

【請求項 4】

前記溶液に発色剤を加える際に、前処理又は / 及び後処理するステップを有することを請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の簡易呈色分析方法。

【請求項 5】

前記選択性吸着剤は、界面活性剤にて修飾されていることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の簡易呈色分析方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかの簡易呈色分析方法に用いるための分析具であって、透視性及び可撓性を有する容器からなり、前記容器の内部は通液性の仕切壁にて複数の試料室に仕切られていることを特徴とする分析具。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、分析対象とする成分を試薬にて呈色させることで、その濃度を目視又は機器によって測定できる簡易分析方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

溶液中の目的成分の濃度を簡易的に目視等で測定する方法としては、目的成分と反応し発色する呈色試薬を試料に加え、その発色の色調変化の程度で分析する比色分析法が公知である。

しかし、目的成分の濃度が低い場合には発色する色調の変化が小さく、高感度で測定するのが困難である。

【0003】

そこで本出願人は、これまでにホルムアルデヒドを対象としたものであるが、呈色した試料水をメンブランフィルターを用いて濾過濃縮し、このメンブランフィルターに定着した色調に基づく測定方法を提案している（特許文献 1）。

また特許文献 2 には、試料中のマンガンを疎水的なイオン会合体にし、これを濾過膜に化学的に吸着捕集することで低濃度のマンガン在现场で定量できる技術が開示されている。

【0004】

しかし、これらの測定方法は試薬にて発色させた有色成分をイオン会合体に変換するステップ、及びメンブランフィルター等で分離濃縮するステップ等が必要であった。

そこで、少量の試料であってもより簡単な操作で高感度に濃度測定できないか検討した結果、本発明に至った。

【先行技術文献】**【特許文献】****【0005】**

【特許文献 1】 特許第 4 7 6 9 9 4 0 号公報

【特許文献 2】 特開 2 0 1 2 - 4 7 7 1 4 号公報

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、有色成分を簡便に濃縮でき、少量の試料で高感度に測定できる簡易呈色分析方法の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明に係る簡易呈色分析方法は、分析の対象となる溶液に、発色剤と、沈降性又は浮上性の選択性吸着剤とを、同時に又は順次加えることを特徴とする。

ここで沈降性又は浮上性の選択性吸着剤とは、分析試料となる溶液に加えると、溶液よりも比重が大きく沈降する吸着剤又は溶液よりも比重が小さく、溶液の上部に浮上する吸着剤をいう。

このように試料の溶液に加えると沈降する吸着剤や浮上する吸着剤を用いると、呈色試薬により発色した目的成分が吸着剤に吸着濃縮された状態で沈降又は浮上するので、その吸着剤に定着した色調の濃淡変化が大きく表れ、目的成分の濃度測定を高感度に行うことができる。

【0008】

この場合に、発色剤による目的成分の発色と吸着剤による吸着濃縮が同時に行われてもよく、発色剤（呈色試薬）で目的成分を発色させた後に吸着剤に吸着させてもよい。

また、溶液に発色剤を加える前に中間生成物を生成させる等の前処理するステップや、発色後に吸着剤に吸着しやすいように後処理するステップを有してもよい。

【0009】

本発明において、選択性吸着剤は微粒子であるのが好ましい。

微粒子にすることで比表面積が増大し、吸着濃縮効果が向上する。

本発明に用いられる沈降性の吸着剤としては特に限定はないが、例えばシリカゲル等の微粒子が例として挙げられる。

また、イオン交換樹脂等の粒子でもよい。

浮上性の吸着剤としては、中空のビーズ等、浮上性の粒子を用いることができる。

【0010】

シリカゲルの微粒子は、各種粒径分布のものが市販されている。

粒度分布として、 $45 \sim 75 \mu\text{m}$ 、 $75 \sim 105 \mu\text{m}$ 、 $63 \sim 212 \mu\text{m}$ 、 $45 \sim 105 \mu\text{m}$ 等のものを用いることができる。

シリカゲルの微粒子は表面がマイナスの電荷を帯びているので、陽イオン性の有色成分を吸着するのに適している。

また、シリカゲルの表面を長鎖アルキル陽イオン等の界面活性剤で修飾すると、陰イオンや中性の有色成分を吸着させることもできる。

【0011】

本発明の濃度測定に用いる呈色分析用の容器（分析具）は、外部から色調の濃淡が識別できるものであれば制限がない。

発色や吸着等のステップが2段以上に分かれている場合には、本発明に係る簡易呈色分析方法に用いるための分析具であって、透視性及び可撓性を有する容器からなり、前記容器の内部は通液性の仕切壁にて複数の試料室に仕切られているものが好ましい。

【発明の効果】

【0012】

本発明に係る簡易呈色分析方法を用いた目的成分の濃度測定にあつては、目的成分を発色させると同時に又は発色後に吸着剤に吸着濃縮させ沈降又は浮上させることにより、吸着剤が集積し定着した色調の濃淡比較が容易となる。

これにより現地で少量の試料を用いて、簡便に測定できる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】呈色（発色）と吸着が同時進行し、シリカゲルが沈降する説明図である。

10

20

30

40

50

- 【図 2】 Fe^{2+} イオンを呈色分析した例を示す。
- 【図 3】シリカゲルの粒度分布 S_1 : $45 \sim 75 \mu m$, S_2 : $63 \sim 212 \mu m$ のものを用いた Fe^{2+} 濃度と吸着量変化のグラフを示す。
- 【図 4】分析試料中の腐食物質の影響を調査した結果を示す。
- 【図 5】ホルムアルデヒドの濃度測定例を示す。
- 【図 6】酵素法によりリン酸イオンの濃度を測定した例を示す。
- 【図 7】シリカゲルの表面を陽イオン界面活性剤で修飾した場合の測定原理の説明図である。
- 【図 8】シリカゲルの表面を CTAB (臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム) で修飾した例を示す。 10
- 【図 9】CTAB 修飾したシリカゲルを用いた Ni^{2+} イオンの分析例 (中性分子又は陰イオン) を示す。
- 【図 10】CTAB 修飾したシリカゲルを用いた Zn^{2+} イオンの分析例 (陰イオン錯体) を示す。
- 【図 11】CTAB 修飾したシリカゲルを用いた Ni^{2+} イオンの分析例 (陰イオン錯体) を示す。
- 【図 12】CTAB 修飾したシリカゲルを用いた Zn^{2+} イオンの分析例 (無電荷錯体) を示す。
- 【図 13】CTAB 修飾したシリカゲルを用いた Mn^{2+} イオンの分析例 (陰イオン) を示す。 20
- 【図 14】 NO_2^- イオンの分析例 (発色後の後処理) を示す。
- 【図 15】大腸菌の検出例を示す。
- 【図 16】シリカゲルを塩化ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム [通称: Zephiramine (Zeph)] で修飾した例を示す。
- 【図 17】Zeph 修飾シリカゲルを用いた Mn^{2+} イオンの分析例を示す。
- 【図 18】陰イオン交換樹脂を用いた Ni^{2+} イオンの分析例を示す。
- 【図 19】一室からなる分析具の例を示す。
- 【図 20】A, B の二室からなる分析具の例を示す。
- 【図 21】ホルムアルデヒドと MBTH との反応の説明図である。
- 【図 22】本発明に係る分析具を用いたホルムアルデヒドの測定例を示す。 30
- 【図 23】浮上性の中空ガラス粒子を用いた例を示す。
- 【発明を実施するための形態】
- 【0014】
- 本発明に係る簡易呈色分析方法を用いた濃度測定法を、具体例を挙げて以下説明する。
- 図 1 に測定 (分析) の原理を示す。
- シリカゲルは多孔性の SiO_2 であり、表面は $[SiO^-]$ からなるマイナスの電荷を帯びている。
- 例えば Fe^{2+} イオンを含む水溶液に phen (フェナントロリン) を加えると、疎水性の有色フェナントロリン錯陽イオンが生成され、シリカゲルの表面に選択的に吸着捕集される。 40
- これにより発色した錯体がシリカゲルに吸着されると同時に沈降するので、容器の底部に集積したシリカゲルの色調の濃淡を例えば、予め Fe^{2+} イオン濃度と対応させた標準色列表に照らし合せて濃度を読みとることができる。
- その実施例を図 2 に示す。
- Fe^{2+} イオンの濃度が 1 ppm 以下であっても、3 分間以下の所要時間で測定できた。
- この場合に、図 19 に示したような一室の吸い込み式の分析具を用いると現地での測定が容易になる。
- 分析具は透視性及び可撓性を有する。
- 【0015】 50

Fe^{2+} イオンの濃度測定に対するシリカゲルの微粒子のサイズの影響を調査した結果を図3のグラフに示す。

図3のグラフ中、 S_1 は粒度分布 $45 \sim 75 \mu m$ のものであり、 S_2 は同粒度分布 $63 \sim 212 \mu m$ のものである。

いずれの場合も Fe^{2+} イオンの初期濃度に対する吸着量の変化は、ほぼ同じであった。

【0016】

次に、シリカゲルの吸着の選択性について調査した結果を図4に示す。

$Fe(phen)_3^{2+}$ 錯体が $0.5 ppm$ 含まれる水溶液に腐植物質を $25 ppm$, $100 ppm$ 加えると、錯体の色調が全く判別できなかったが、シリカゲルを加え、沈着させることで色調の判別が可能であり、(f)に示すように腐植物質はシリカゲルに全く吸着していなかった。

このことから、シリカゲルは、この有色錯体を選択的に吸着していることが確認できた。

【0017】

ホルムアルデヒドの分析例を図5に示す。

ホルムアルデヒドに3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)を加えると、図21に示すように中間生成物(アジン)を経由して、発色生成物が得られる。

この反応の流れを図21に示し、このような2段のステップによる分析に適した分析具の構造例を図20に示す。

透明なチューブ状の容器の内部に通液性を有する仕切壁(多孔板)を設けることで、A, Bの2つの試料室を有するにした。

図20は Fe^{2+} の分析例であるが、図22に雨水中のホルムアルデヒドを分析した例を示す。

このような分析具は、複数の反応ステップを有する分析に好適である。

【0018】

図6に、 PO_4^{3-} イオンを酵素反応により得られた、4-アミノアンチピリン誘導体をシリカゲルに吸着させた例を示す。

この場合に、酵素反応に約5分間要したものの、シリカゲルへの吸着は速やかであり、 $0.16 ppm$ 以下のリン酸態リンの目視分析ができた。

【0019】

これまでは、シリカゲルに陽イオンを吸着させる例を示したが、陰イオンや中性分子を吸着及び沈降させる場合の原理を図7に示す。

シリカゲルの微粒子の表面を界面活性剤にて修飾すると、プラスの電荷の場やイオン対による中性の場を形成することができる。

例えば、図8にシリカゲルの表面にCTAB(臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム)を修飾合成する例を示す。

界面活性剤修飾シリカゲルは化学結合法よりも簡便に製作でき、特に有用である。

この、修飾シリカゲルCTAB(SiO_2)を用いて、 Ni^{2+} イオンを分析した例を図9に示す。

Ni^{2+} イオンにPAR[4-(2-ピリジルアゾ)レソルシノール]を発色剤として加え、中性又は陰イオン性の錯体を生成させるとともに、CTAB(SiO_2)に吸着させた。

これにより、 $1 ppm$ 以下の Ni^{2+} イオンの分析が可能であった。

図10は、 Zn^{2+} に5-Br-PAPS{2-(5-プロモ-2-ピリジルアゾ)-5-[N-n-プロピル-N-(3-スルホプロピル)アミノ]フェノールニナトリウム塩}を加え、陰イオン錯体を形成し、CTAB(SiO_2)に沈着させた例を示す。

図11は、 Ni^{2+} イオンを陰イオンに錯体にし、分析した例を示す。

図12は、 Zn^{2+} イオンにPAN[1-(2-ピリジルアゾ)-2-ナフトール]を加え、無電荷錯体にして分析した例を示す。

10

20

30

40

50

図 1 3 は、 Mn^{2+} イオンを酸化剤にて発色させることで分析した例を示す。

図 1 4 は、 NO_2^- イオンの分析例を示す。

この場合に、酸性溶液中で生成したアゾ色素は、シリカゲルに殆ど吸着されなかったが、pH を中性に調整することで吸着及び分析ができた。

図 1 5 は、大腸菌に対して酵素によってインジゴ系色素を形成させ、分析した例を示す。

このように、シリカゲルを界面活性剤で修飾することで、陰イオン，中性分子も分析できることが明らかになった。

【 0 0 2 0 】

次に図 1 6 は、シリカゲルを Zephiramine で表面修飾した例を示し、図 1 7 に Mn^{2+} イオンを分析した例を示す。

10

Zeph(SiO_2)もCTAB(SiO_2)と同様に選択吸着性を示した。

【 0 0 2 1 】

図 1 8 は、陰イオン交換樹脂を用いて Ni^{2+} イオンを分析した例を示す。

このように、陰イオン交換樹脂の吸着性と沈降性を利用することで分析に使用できることが明らかになった。

【 0 0 2 2 】

次に図 2 3 に浮上性を有する中空ビーズとして中空のガラス粒子の表面をCTABで修飾した例を示す。

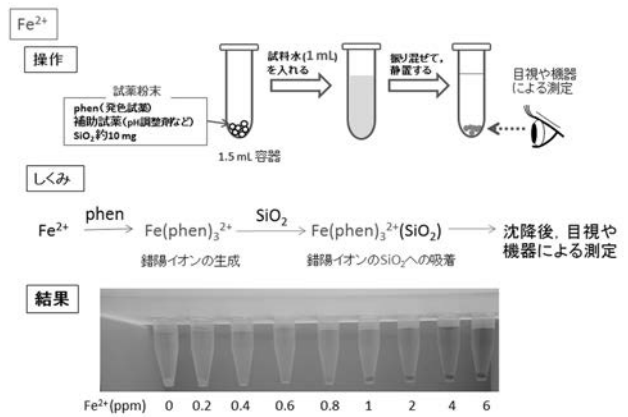
このように本発明は浮上性の吸着剤を用いてもよいことが明らかになった。

20

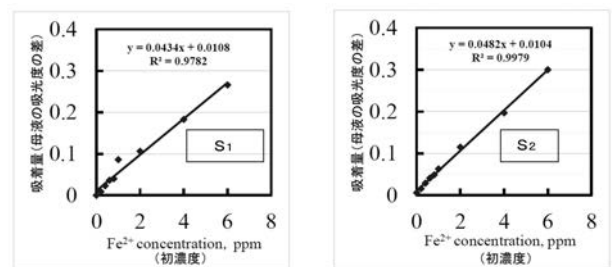
【 図 1 】



【 図 2 】



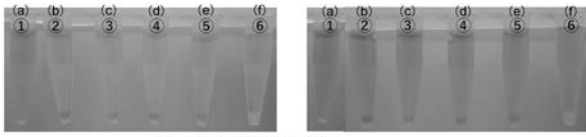
【 図 3 】



【 図 4 】

腐植物質 (25 ppm, 100 ppm) と $\text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ の共存下でシリカゲル (4種) を添加して、吸着法の有効性を検討した。

【結果】 ・腐植物質 25 ppm
・鉄濃度 0.5ppm
・シリカゲル 10 mg



(a) 0.5 ppm 錯体 + 腐植物質
(b) (a)の溶液にシリカゲル (63~212 μm) を加えた
(c) (a)の溶液にシリカゲル (75~105 μm) を加えた
(d) (a)の溶液にシリカゲル (45~75 μm) を加えた
(e) (a)の溶液にシリカゲル (45~105 μm) を加えた
(f) 腐植物質 + シリカゲル

【 図 5 】

ホルムアルデヒド (HCHO)

しくみ

ホルムアルデヒド + MBTH (3 min) → 中間生成物

操作

試料水にMBTHを入れ、3min反応させる

↓

反応液を FeCl_3 と SiO_2 (10 mg)を入れた容器に移す

↓

振り混ぜ後、静置して、沈着した着色 SiO_2 の色調を読み取る

SiO₂への吸着

酸化型MBTH(黄色)

青色陽イオン色素

< 0.1 ppm

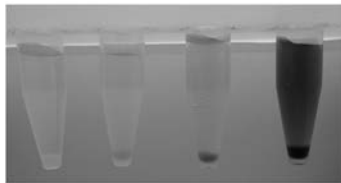
雨水中のHCHO濃度測定例

【 図 6 】

PO_4^{3-} (酵素法)

しくみ PO_4^{3-} → 酵素反応 → 4-アミノアンチピリン誘導体 → SiO_2 への吸着

結果



PO_4^{3-} -P ppm (リン酸態リン) 0.02 0.07 0.16 2.1

SiO_2 (10 mg)

【 図 8 】

CTAB $(\text{C}_{16}\text{H}_{33})\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$
臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム

別名: 臭化セチルトリメチルアンモニウム

【表面処理操作】
三角フラスコ

↓

SiO_2 CTAB 溶液

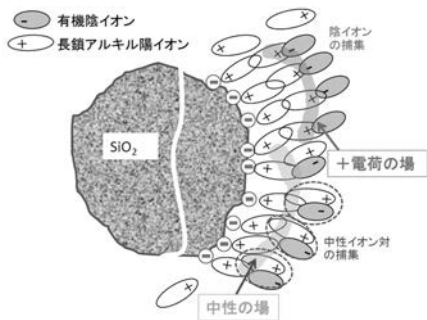
↓

数時間後 上澄みを捨てて、水を加えて、攪拌、静置
同じ操作を繰り返す
最後に上澄みを捨てて、水で流し込みながら、ろ紙でろ過

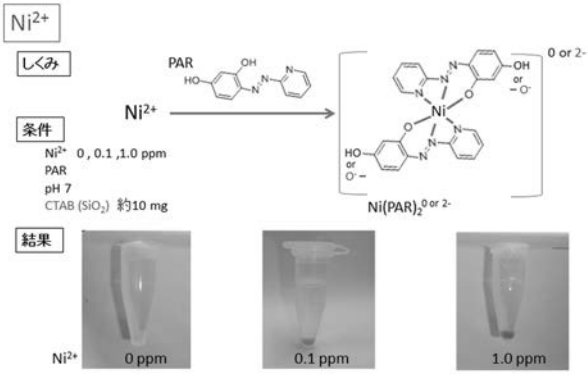
↓

時計皿上にろ紙を広げ、風乾、シリカゲル乾燥

【 図 7 】

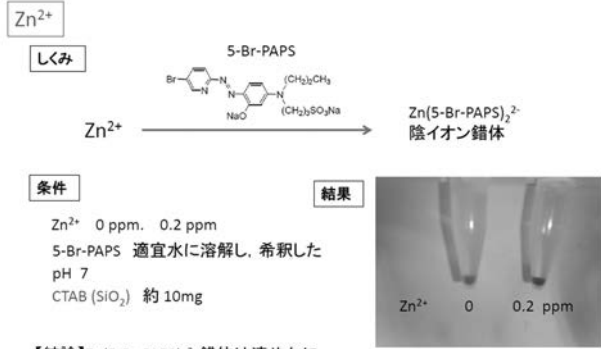


【 図 9 】



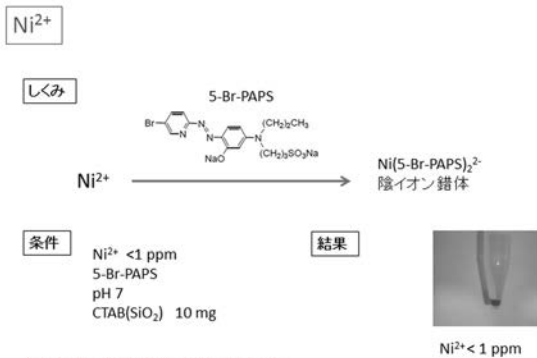
【結論】Ni(PAR)₂は速やかにCTAB (SiO₂)に捕集される。1 ppm 以下のNi²⁺を分析できた。

【 図 1 0 】



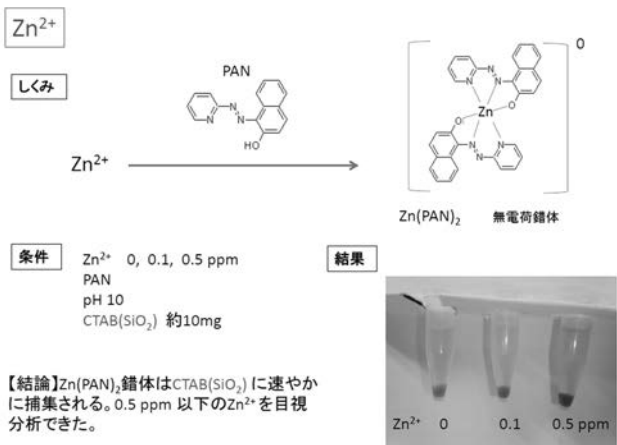
【結論】Zn(5-Br-PAPS)₂²⁻ 錯体は速やかにCTAB (SiO₂)に捕集された。0.2 ppmを識別できた。

【 図 1 1 】



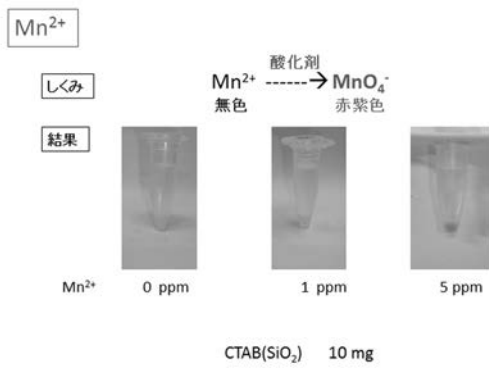
【結論】Ni(5-Br-PAPS)₂²⁻錯体は速やかにCTAB (SiO₂)に捕集された。1ppm以下のNi²⁺を識別できた。

【 図 1 2 】



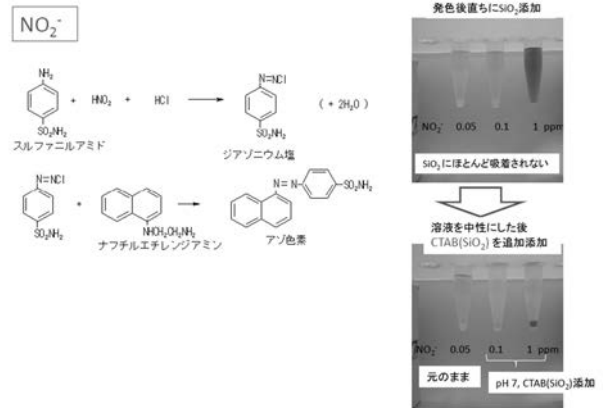
【結論】Zn(PAN)₂錯体はCTAB(SiO₂)に速やかに捕集される。0.5 ppm 以下のZn²⁺を目視分析できた。

【 図 1 3 】



【結論】生成したMnO₄⁻は速やかに、CTAB(SiO₂)に捕集された。1 ppmのMnを目視分析できた。

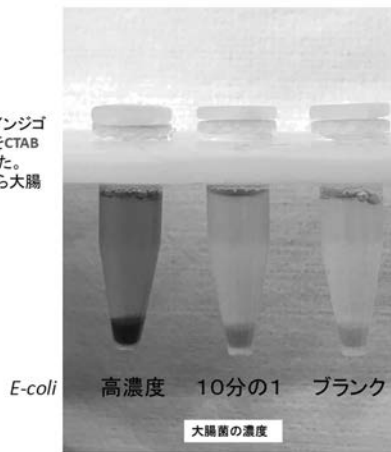
【 図 1 4 】



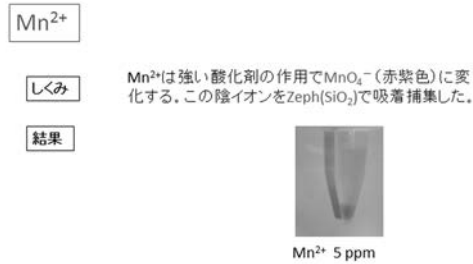
【 図 1 5 】

大腸菌の検出

大腸菌由来の酵素によってインジゴ系色素を生成させ、その色素をCTAB(SiO₂)に吸着させることができた。CTAB(SiO₂)の色調の変化から大腸菌の濃度を知ることができる。



【 図 1 7 】



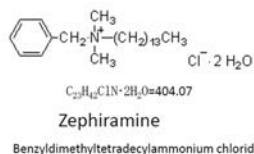
【結論】

CTAB(SiO₂)と同様に速やかにMnO₄⁻を捕集した。濃縮なしの色調に比べて、2倍以上の感度の向上が見られた。色調は3時間経過しても変化しなかった。

【 図 1 6 】

Zeph(SiO₂)の作製

CTAB(SiO₂)と同様の手順で作製した。Zephiramine (以下Zeph) 水溶液にシリカゲルを浸漬し、一夜放置後、水洗、ろ過、乾燥させた。



Alizarine Red S を用いた吸着性能試験

【結果】



【結論】

CTAB(SiO₂)と同レベルあるいはそれ以上の強い吸着性が確認された。他の様々な陽イオン界面活性剤を用いてシリカゲルを処理することによって機能の異なる種々の吸着剤を作製できる。

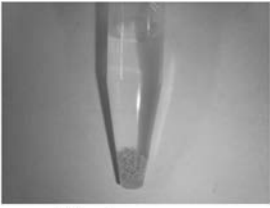
【図 18】

Ni²⁺

しくみ・操作

$Ni^{2+} \xrightarrow[pH\ 7]{PAR} Ni(PAR)_2^{0\ or\ 2-} \rightarrow$ 陰イオン交換樹脂への吸着

結果



Ni²⁺ 1 ppm

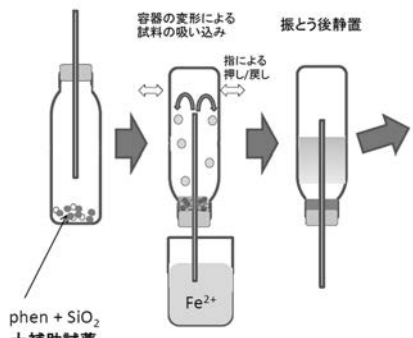
CN(C)CC1=CC=C(C=C1)CC2=CC=CC=C2

【図 19】

Fe²⁺

$Fe^{2+} + 3phen \rightleftharpoons Fe(phen)_3^{2+}$

Fe(phen)₃²⁺の捕集実験



容器の変形による試料の吸い込み

振とう後静置

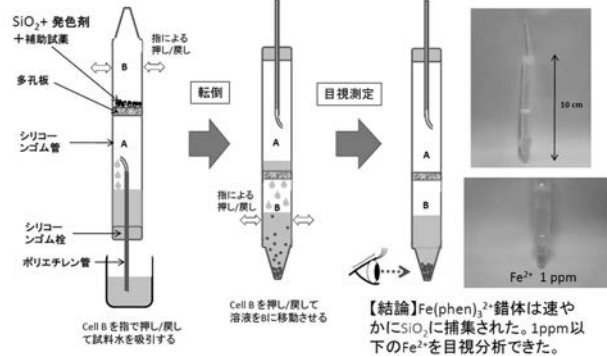
指による押し戻し

phen + SiO₂ + 補助試薬

Fe²⁺

【図 20】

(a) 試料の採取 (b) 発色と吸着・沈降分離 (c) 目視による測定



SiO₂ + 発色剤 + 補助試薬

多孔板

シリコーンゴム管

シリコーンゴム栓

ポリエチレン管

Cell Bを指で押し戻して試料水を吸引する

指による押し戻し

転倒

目視測定

10 cm

Fe²⁺ 1 ppm

Cell Bを押し戻して溶液をBに移動させる

【結論】Fe(phen)₃²⁺錯体は速やかにSiO₂に捕集された。1 ppm以下のFe²⁺を目視分析できた。

【図 22】

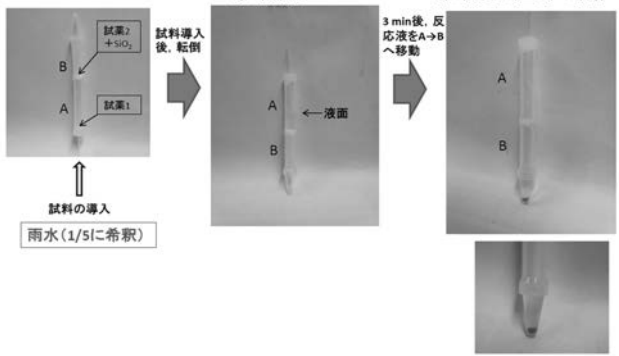
試料導入前

試料導入後、転倒

3 min後、反応液をA→Bへ移動

A室における第1段反応

B室における第2段反応(呈色) + 吸着



試料2 + SiO₂

試料1

雨水 (1/5)に希釈

液面

【図 21】

HCHO

2ステップの呈色反応工程を含む事例

ホルムアルデヒド

第1段反応

3-Methyl-2-benzothiazolonehydrazine (MBTH)

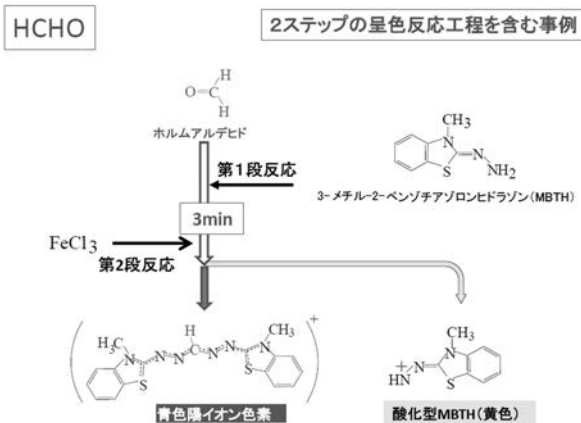
3min

FeCl₃

第2段反応

青色陽イオン色素

酸化型MBTH(黄色)



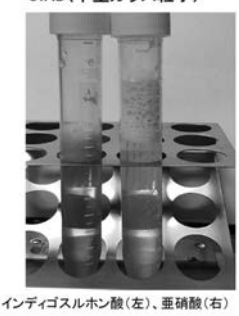
【図 23】

CTAB(中空ガラス粒子)

【結果・結論】

- 陰イオン色素の吸着と分離
インディゴスルホン酸陰イオンをCTAB(中空ガラス)粒子に捕捉して、水相から浮上分離することができた。
- 亜硝酸イオンの分析
亜硝酸イオンをアゾ色素に変換してCTAB(中空ガラス)粒子に捕捉し、水相から浮上分離することができた。

最適条件を検討することによって、この手法は亜硝酸イオンをはじめいろいろな成分の目視あるいは機器分析への応用の可能性がある。



インディゴスルホン酸(左)、亜硝酸(右)

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G042 AA01 BC07 BC08 BD08 BE05 CB03 DA01 FA11 FA19
2G054 AA02 AB07 BA04 BB02 BB08 CA06 CA10 CA20 CA30 CD03
CE02 CE10 EA04 EA06 FA06 FB07 GB01 GB04 GB05 GE01
GE05 JA11
4G066 AA22B AB13D AB21D BA09 BA36 BA38 BA41 CA10 CA25 CA27
CA41 CA46 DA07