

RGB解析を用いる紙製分析デバイスによる環境水中の銅の定量

古川 真衣 (三重大学 大学院工学研究科, maif@chem.mie-u.ac.jp)

立石 一希 (三重大学 国際環境教育研究センター, tateishi@gecer.mie-u.ac.jp)

勝又 英之 (三重大学 大学院工学研究科, hidek@chem.mie-u.ac.jp)

山口 翔瑚 (三重大学 工学部, 415594@m.mie-u.ac.jp)

金子 聡 (三重大学 大学院工学研究科, kaneco@chem.mie-u.ac.jp)

Determination of copper in environmental water samples by paper-based analytical device combined RGB color analysis

Mai Furukawa (Graduate School of Engineering, Mie University, Japan)

Ikki Tateishi (Mie Global Environment Center for Education and Research, Mie University, Japan)

Hideyuki Katsumata (Graduate School of Engineering, Mie University, Japan)

Shogo Yamaguchi (Faculty of Engineering, Mie University, Japan)

Satoshi Kaneco (Graduate School of Engineering, Mie University, Japan)

要約

本研究では、特別な分析機器を使用せずに銅イオンを測定する目的で、検出領域としてウェル状スポットを有する紙製分析デバイス (PAD) を開発した。PADは、トリクロロシランの化学気相成長 (CVD) でクロマトグラフィー紙に疎水性障壁を形成させることで作製した。検出・定量領域には、銅との反応で茶色を呈する錯化剤として、ジエチルジチオカルバミン酸 (DDTC) を固定した。水試料中の銅の検出に適用した後、作製したPADは、画像として取り込まれ、RGB値へ変換することで定量に適用された。

キーワード

簡易分析, 比色分析, RGB解析, PAD, 銅

1. 緒言

重金属は、工業利用などが盛んである一方、その環境汚染は深刻な問題の一つである。銅 (Cu) は、動植物にとっては重要な微量元素である一方で、過剰摂取によっては、黄疸、肝臓障害など様々な症状を引き起こす可能性がある (Lisa and Ching, 2003)。そのため、世界保健機関は、飲料水中の最大許容濃度を 1.5mg L^{-1} (WHO, 2004)、日本においては、一律排水基準を 3mg L^{-1} (環境省, 1971) と定めている。したがって、様々な環境水中の銅濃度を簡便に測定する方法は重要である。

現在、微量金属元素を定量するために一般的に用いられている分析法には、原子吸光分析法 (Anna et al., 2012)、ICP発光分析法 (Yuemei et al., 2006)、ICP質量分析法 (Sebastian et al., 2011) などが挙げられる。これらの方法は、選択性があり、高感度に定量することが可能だが、高価な装置や、高度な分析技術が必要とされる。

近年、紙上に一連の分析手順を集約させたものである、紙製分析デバイス (Paper based analytical device: PAD) が、高感

度、簡便性、携帯性、低コストなどといった利点を有するとして、大きな注目を集めている。PADの研究は、医療現場でのポイントオブケア (David et al., 2015) に主な焦点が当てられていたが、環境分析 (Maria et al., 2018) などの分野への応用の報告も増えている。

PADの製造方法として、親水性紙への疎水性物質による壁の構築が報告されており、フォトリソグラフィー法 (Martinez et al., 2007)、印刷法 (Shoumei et al., 2012) などの方法がある。中でも化学気相成長 (CVD) を利用する方法は、熱的、化学的に安定な疎水性障壁を、特別な装置がなくても作製することが可能である。

比色分析は、発色試薬を使用することで検体濃度を色調変化として表す手法であり、金属、タンパク質などの分析に広く適用されてきた (Saravanan et al., 2012)。一般には、吸光度法を併用することが多いが、デジタル画像処理の進歩により、色をデジタルデータとして取得した後、数値化させることで、測定に応用させる例も報告されている (Firdaus et al., 2014)。

中でも、赤 (Red)、緑 (Green)、青 (Blue) を混ぜて色を表す加法混合の一種であるRGB解析は、各要素を $0 \sim 255$ の範囲で変動させ、組み合わせることで色を表現させるため、色を数

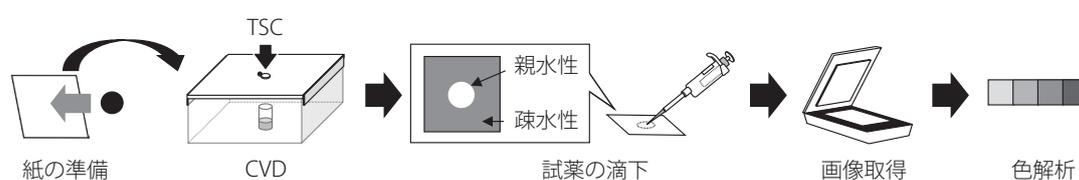


図1: PAD作製から色解析までの流れ

値として可視化することができる (Paolo et al., 2012)。これは、人が視覚的に判断するよりも遥かに再現性がある。また、カメラやスキャナーなどの画像取得ができる機材があれば良いので、特別な分析機器や技術は不要である。

本研究では、疎水性剤としてトリクロロシランを用いた CVD によって PAD を作製した。この製造技術は、真空や温度調節を必要とせず、短時間で実行された。水試料中の銅を発色させるために、銅との反応によって茶色を呈するジエチルジチオカルバミン酸を適用し、PAD に含浸させた。そして、試料との反応後に現れる発色団をデジタルイメージングし、RGB 値に変換することで銅の定量を試みた。

2. 実験

2.1 試薬

全ての試薬は、分析等級以上のものを追加精製することなく使用した。全ての実験を通して、Advantec ultra pure water system (CPW-102) で製造された精製水を使用した。

銅標準溶液 (1000 mg L^{-1}) は、和光純薬工業から購入した。銅の形態は、2価の陽イオン (Cu^{2+}) であった。試料溶液は、標準溶液を適切に希釈することで調製した。ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム三水和物は、和光純薬工業製であり、比色剤として選択された。トリクロロシランは、東京化成工業株式会社から購入し、疎水性障壁を形成させるために使用した。クロマトグラフィー紙は、Advantec 製であり、純粋なセルロース繊維で構成されていた。干渉元素を含む溶液は、一般的なアルカリ金属、アルカリ土類金属、遷移金属の硝酸塩、または塩酸塩を溶解させて調製した。

2.2 紙製デバイスの作製

PAD を作製するための CVD は、シリコンゴム製のパッキンが付いた密閉容器内で行われた。容器体積は 1.3 L であり、中央には TCS を添加するための小瓶を設置した。

塩化ビニル製のテープを任意の形状に切り出し、クロマトグラフィー紙に貼り付けた。今回、テープを $\phi 6 \text{ mm}$ の円形に切り出した。紙を CVD 用容器に入れた後、トリクロロシラン (TCS) を滴下して CVD を行った。容器から紙を取り出し、テープを除去することで、テープ下の紙の領域は親水性になり、他の領域は疎水性になった PAD を得た。

2.3 銅イオンの測定

銅イオン検出のために、 2 wt\% ジエチルカルバミン酸溶液 $10 \mu\text{L}$ を、PAD 上のウェルスポットに添加し、室温下で自然乾燥させた。

次に、銅イオンを含む試料溶液 $50 \mu\text{L}$ を、作製した DDTC 含浸 PAD の検出領域に滴下し、反応させた。乾燥後、スキャナー (RICOH MP1301) でカラー画像として取り込んだ。得られた色は、Adobe Photoshop Elements 8 を使用して赤緑青 (RGB) の要素に分けて数値化した。

2.4 実試料の前処理

実試料の分析には、三重県津市にて採取した井戸水、河川水、雨水が適用された。試料は分析前に、孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のセ

ルロースメンブレンフィルターで試料を濾過した。

実試料に対する提案手法の正確さと精度が、回収率と相対標準偏差に基づく標準添加法によって確認された。

3. 結果と考察

3.1 紙製流体デバイスの作製及び使用条件

PAD の作製条件の検討のために、 50 mg L^{-1} ローダミン B 溶液を色素として使用した。溶液をスポットに滴下することで、スポット場所を示す枠線に対する色素の広がりが確認された。

3.1.1 TCS 滴下量

クロマトグラフィー紙へ疎水性障壁を形成させるため、蒸着させるトリクロロシラン (TCS) の最適な滴下量を検討した。蒸着時間は 10 分に固定した。結果を図 2 に示す。 $15 \mu\text{L}$ 以下の場合、溶液が枠外に染み出した。 $30 \mu\text{L}$ では、親水領域が目標よりもやや狭い範囲となった。よって、最適な TCS 量を $20 \mu\text{L}$ とした。

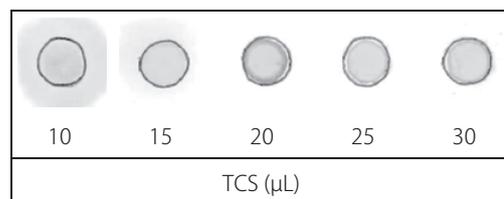


図 2：蒸着時間 10 分における TCS 量の影響

3.1.2 蒸着時間

続いて、滴下するトリクロロシランを $20 \mu\text{L}$ に固定し、蒸着に要する時間を検討した。結果を図 3 に示す。蒸着時間が 10 分未満でも、疎水性障壁を形成させることができると分かった。しかし、1、2 分の場合、溶液が枠線を越えて染み出した。したがって、十分に CVD を行うことができる時間として、3 分を選択した。

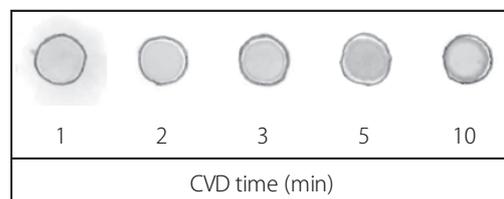


図 3：PAD への試料体積の影響

3.1.3 試料体積

作製した PAD への最適な試料溶液の体積を検討した。図 4 に、 $40 \sim 200 \mu\text{L}$ の範囲で滴下量を変化させた結果を示す。試料体積の増加に従い、紙上で形成される水滴が大きくなり、疎水領域外への侵出も観察された。 $50 \mu\text{L}$ を最適な試料体積と決定した。

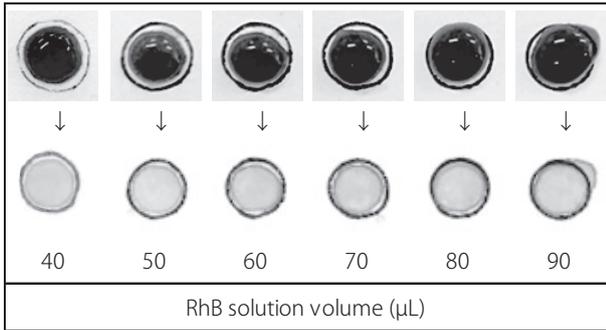


図4：滴下直後と乾燥後のPADへの試料体積の影響

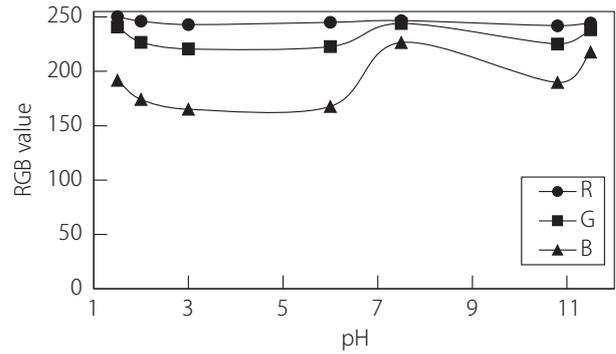


図6：RGB値に対するpHの影響

3.1.4 分析までの所要時間

試料溶液をPADに滴下した後、乾燥させ、RGB解析ができるまでに要する時間を測定した。実験は、室温(25℃)で、風の影響を受けない場所で行われ、50 μLのローダミンB溶液を滴下することで検討した。結果を図5に示す。結果から、分析までに要する時間は、1時間程度であった。

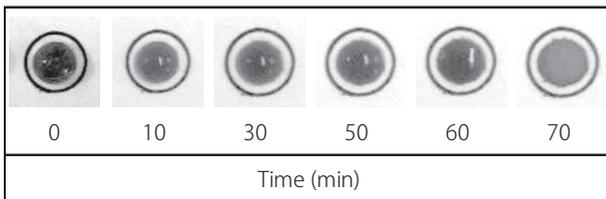


図5：試料50 μLに対する分析までにかかる時間

3.2 pHの影響

試料溶液中の銅と、DDTCが反応することで生じる色に対する、pHの影響を調査した。結果を図6に示す。R、G値に注目すると、pHの変化による大きな値の変化を観察することができなかった。よって、目的試料を測定する際、pHを調整する必要がほとんどないことが確認された。

3.3 干渉イオンの影響

実試料に適用するには、他元素の影響が問題になる。銅 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ を含む試料溶液に、環境試料水に多く含まれるイオンを混在させることで、RGB解析に対する一般的な共存イオンの影響を調査した。表1に示されるように、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、鉛、亜鉛、クロムは、提案手法に対して大きな影響を及ぼさなかった。

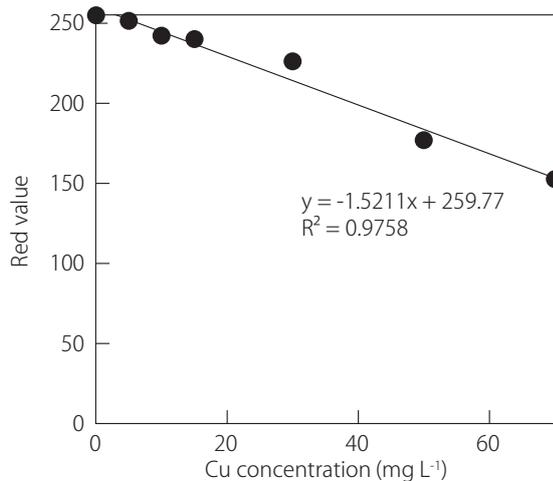
しかし、マンガンや鉄を含有した溶液では、反応後のスポットの色が黒く変色した。これは、DDTCと反応して発色を呈したためだと考えられた。そのため、マンガンと鉄に関して、目的試料を測定する際には、あらかじめマンガンと鉄を除去するか、影響を受けない濃度まで下げる必要があった。

3.4 分析性能

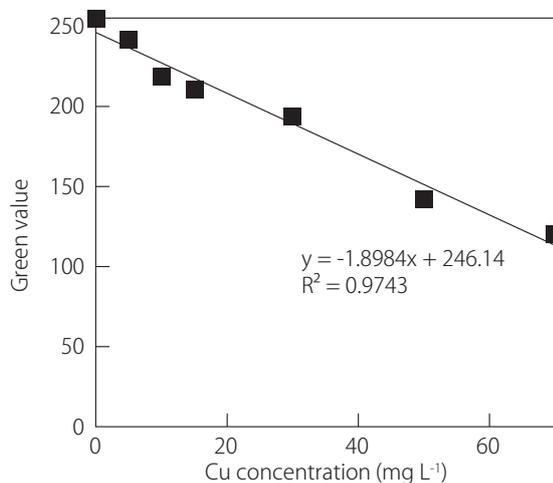
最適条件下において、試料溶液の銅濃度を変化させることによって、RGB値別で検量線の検討を行った。検量線の線形範囲(ダイナミックレンジ)は、図7に示す通り、0~70 mg L⁻¹の範囲で得られ、R: $y = -1.521x + 259.8$ 、G: $y = -1.898x + 246.1$ 、B: $y = -2.194x + 208.9$ であった。直線性は、GとRでは優れていたが、Bでは良い直線性を得られなかった。検出限界(3/N)は、R: 0.49、G: 0.30、B: 0.45 mg L⁻¹であった。また、銅5 mg L⁻¹を含む試料を5回測定した場合の再現性は、相対標準偏差(RSD)として算出され、R: 1.0%、G: 2.0%、B: 3.7%

表1：共存元素から受ける影響

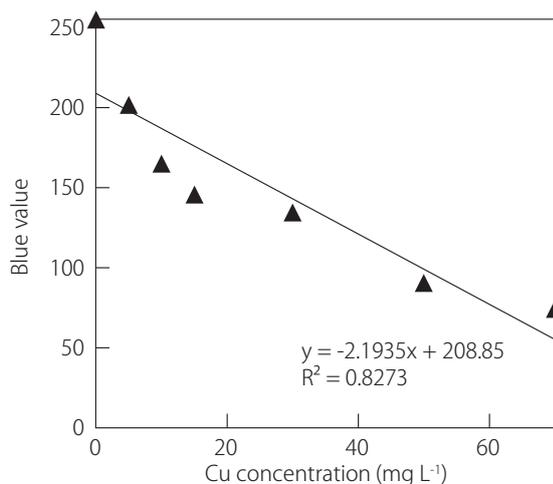
Interference	Concentration (mg L ⁻¹)	Recovery ± standard deviation		
		R	G	B
Na ⁺	30000	99.8 ± 0.6	100.7 ± 2.7	104.7 ± 7.5
Mg ²⁺	200	101.4 ± 1.3	103.1 ± 2.5	104.3 ± 3.6
K ⁺	200	101.5 ± 2.7	102.1 ± 6.7	101.2 ± 10.5
Ca ²⁺	200	100.6 ± 1.0	101.6 ± 1.3	103.6 ± 0.5
Mn ²⁺	1	103.5 ± 0.4	107.1 ± 0.5	112.9 ± 0.9
Fe ³⁺	1	96.5 ± 0.4	95.7 ± 0.0	96.8 ± 0.2
Pb ²⁺	10	100.7 ± 0.5	102.1 ± 0.8	105.1 ± 1.3
Zn ²⁺	10	101.9 ± 0.8	103.0 ± 1.9	101.3 ± 4.5
Cr ₂ O ₇ ²⁻	20	99.8 ± 1.0	103.4 ± 1.5	110.6 ± 2.8
NO ₃ ⁻	1300	101.4 ± 1.3	103.1 ± 2.5	104.3 ± 3.6
Cl ⁻	45000	99.8 ± 0.6	100.7 ± 2.7	104.7 ± 7.5



(a) Red



(b) Green



(c) Blue

図7：銅濃度0～70 mg L⁻¹におけるRGB値の変化

であった。

結果から、提案手法を用いた銅の測定には、検量線の傾きが大きく、安定性のあるG値が最も優れていることが判明した。

3.5 実試料への適用

最適化された条件下で、実試料の分析を行った結果を、表2に示す。実試料としては、井戸水、河川水、雨水を用い、G値を中心に調査した。結果から、特に河川水、雨水では10%程度の誤差となり、満足のいく結果になった。

また、R値、B値は濃度毎による値の変動が大きく、定量には不向きであることが観察された。これは、検量線の傾きが小さいため、測定値のわずかなズレが大きな誤差となることが一つの要因と考えられる。

4. まとめ

クロマトグラフィー紙上へ、TCSのCVDによって疎水性障壁を形成させることで、紙製分析デバイスは調製された。提案手法では、特別な機材を使用せず、真空、加熱条件なしに、短時間(3分)で任意の領域を親水性-疎水性にすることができた。このPAD技術は、比色分析とRGB解析を組み合わせることによって、水試料中の銅イオンの定量に適用、最適化された結果、簡便、低コスト、携帯性、操作性に優れる手法であることが示唆された。今回は、ウェルスポットのPADであったが、より高度な流路の作製を検討することにより、複数元素の同時検出や、共存イオンの影響を受けにくい簡易分析法を開発できる可能性がある。

謝辞

本研究の一部は、三重大学工学部同窓会の研究支援を受けたものです。ここに謝意を表します。

引用文献

- Anna, T., Stanisław, W., Lucyna, L., and Jadwiga, K. G. (2012). Improvement of copper FAAS determination conditions via preconcentration procedure with the use of salicylaldoxime complex trapped in polymer matrix. *Talanta*, Vol. 96, 82-88.
- David, M. C., Jaclyn, A. A., Jaruwan, M., and Charles, S. H. (2015). Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Analytical chemistry*, Vol. 87, No. 1, 19-41.
- Firdaus, M. L., Alwi, W., Trinoveldi, F., Rahayu, I., Rahmidar, L., and Warsito, K. (2014). Determination of chromium and iron using digital image-based colorimetry. *Procedia Environmental Sciences*, Vol. 20, 298-304.
- 環境省(1971). 排水基準を定める省令.
- Lisa, M. G. and Ching K. C. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, Vol. 189, No. 1-2, 147-163.
- Maria, I. A., Badra, M. J., Spas, D. K., and Ian, M. (2018). Developments of microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) for water analysis: A review. *Talanta*, Vol. 177, 176-190.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., and Whitesides, G. M.

表2：実試料への適用

Sample	Spiked (mg L ⁻¹)	Found (mg L ⁻¹)			Spiked/recovery (%)		
		R	G	B	R	G	B
	—	N.D.	N.D.	N.D.	—	—	—
Well water	1	0.84 ± 0.10	0.84 ± 0.04	0.19 ± 0.78	84	84	19
	5	3.05 ± 0.17	3.78 ± 0.79	4.87 ± 1.96	61	76	97
	—	N.D.	N.D.	N.D.	—	—	—
River water	1	1.70 ± 0.13	0.98 ± 0.08	1.16 ± 0.28	170	98	116
	5	4.96 ± 1.60	4.64 ± 3.19	5.34 ± 5.69	99	93	107
	—	N.D.	N.D.	N.D.	—	—	—
Rain water	1	1.40 ± 0.07	0.88 ± 0.03	0.78 ± 0.80	140	88	78
	5	3.55 ± 0.40	5.14 ± 0.98	6.56 ± 1.18	71	103	131

(2007). Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie International Edition in English*, Vol. 48, No. 8, 1318-1320.

Paolo, M., Claudio, A., Federico, P., Francesca, A., Jacopo, A., and Corrado, C. (2012). RGB color calibration for quantitative image analysis: The “3D thin-plate spline” warping approach. *Sensors*, Vol. 12, No. 6, 7063-7079.

Prabhu, S., Somasundaram, V. S., Ashok, M., and Velmathi, S. (2012). Colorimetric and fluorescent sensing of multi metal ions and anions by salicylaldimine based receptors. *Journal of luminescence*, Vol. 132, No. 4, 979-986.

Sebastian, O. K., Angel, A. T., Claudius, A. L., and Karl, J. J. M. (2011). Coupling of a high throughput microelectrochemical cell with online multielemental trace analysis by ICP-MS. *Electrochemistry Communications*, Vol. 13, No. 2, 1533-1535.

Shoumei, W., Lei, G., Xianrang, S., Jinghua, Y., Shenguang, G., Jiadong, H., and Fang, Z. (2012). Paper-based chemiluminescence ELISA: Lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing. *Biosensors and bioelectronics*, Vol. 31, No. 1, 212-218.

Wang, W., Wu, W. Y., Wang, W., and Zhu, J. J. (2010). Tree-shaped paper strip for semiquantitative colorimetric detection of protein with self-calibration. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1217, No. 22, 3896-3899.

WHO (2004). Copper in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.

Yuemei, C., Xijun, C., Yunhui, Z., Xiangbing, Z., Hong, Z., and Ning, L. (2006). ICP-AES determination of trace elements after preconcentrated with p-dimethylaminobenzaldehyde-modified nanometer SiO₂ from sample solution. *Microchemical Journal*, Vol. 83, No. 1, 35-41.

(受稿：2019年12月18日 受理：2020年2月3日)