

[原著論文]

μ PAD による六価クロムの高感度定量

¹浅野 比 ²前田大志朗 ²白石幸英

¹山陽小野田市立山口東京理科大学共通教育センター ²工学部 応用化学科

Sensitive Determination of Hexavalent Chromium Using a μ PAD

¹Hitoshi ASANO, ²Taishirou MAEDA and ²Yukihide SHIRAIISHI

¹Center for Liberal Arts and Sciences, ²Department of Applied Chemistry,
Faculty of Engineering, Sanyo-Onoda City University

Abstract

Chromium has diverse oxidation states, the charges of +3 and +6 for chromium occur the most commonly within chromium compounds. Trivalent chromium (Cr(III)) is not toxic and is essential for living organisms. On the other hand, hexavalent chromium (Cr(VI)) is known to have the strong ability to oxidize and to be a carcinogen. Therefore, it is important selectively to determine of Cr(VI) for the analysis of chromium due to the difference of toxicity between Cr(III) and Cr(VI). 1,5-Diphenylcarbazide (DPC) is a reagent which selectively reacts with Cr(VI) to color violet complex. We have developed a simple and sensitive analysis of Cr(VI) using a micro fluidic paper-based analytical device (μ PAD) with the DPC colorimetric reaction. The fabrication of μ PADs was carried out by melting wax with an oven after the pattern was printed with a wax printer. The detection spots were dropped DPC solution and dried. Then, the sample solution was dropped into the sampling spot and wicked to the detection spots. μ PAD was scanned with a scanner, the color intensity for the detection spots was analyzed by an image analysis software. The RGB intensity of the images was analyzed, and the highest sensitivity was obtained when G-intensity was used. The detection limit of this device for the Cr(VI) analysis was 26.2 μ g/L, the sensitivity for present method has been enhanced compared to the previous method (30 mg/L).

KEY WORDS: Microfluidic paper-based analytical device, Hexavalent chromium, Diphenylcarbazide colorimetric reaction

キーワード：マイクロ流体ペーパー分析デバイス、六価クロム、ジフェニルカルカルバジド呈色反応

1. 緒言

クロム (Cr) の酸化状態は主に三価と六価である。三価クロム (Cr(III)) は、欠乏すると耐糖能異常を引き起こすことから、生体の機能維持のための必須元素とされている¹⁾。一方、六価クロム (Cr(VI)) は、毒性が強く、発がん性のある元素とされている²⁾。したがって、毒性の強い Cr(VI) を選択的に分析することは、Cr の影響を評価する上で非常に重要である。Cr(VI) の定量に関しては、原子吸光光度法³⁾、蛍光 X 線分析法⁴⁾、誘導結合プラズマ発光分析法⁵⁾などが報告されているが、Cr(III) と Cr(VI) を分別する何らかの前処理が必要である。一方、化学発光分析法⁶⁾や吸光光度法⁷⁾は、Cr(VI) と特異的に反応する試薬により、前処理を行うことなく分析することが可能である。

マイクロ流体ペーパー分析デバイス (μ PAD)⁸⁾は、切手大の紙に、分析目的成分と反応して発色する試薬をあらかじめ担持しておき、試料を滴下することで、その発色度合いから目的成分を分析することが可能な素子である。 μ PAD は、安価な生産性、送液ポンプ不要性、高い携帯性、高い廃棄性、操作の簡便性、容易な小型化可能性、臨床現場即時検査 (point-of-care testing, POCT) 可能性、試薬消費量の最小化可能性などの特徴を有する。我々はこれまで、フォトリソグラフィーによる手法で μ PAD を作成し、鉄分析⁹⁾、pH 測定¹⁰⁾、Cr(VI) 分析^{11,12)} に応用してきた。 μ PAD は簡便な分析が可能であるが、機器分析と比較すると一般的にやや感度が低い。フォトリソグラフィーによる μ PAD の修飾法は、精度の高い流路設計が可能となるものの、紫外線照射による紙の変色がブランクを上昇させ、結果として感度低下の原因となっていた。そのため、Cr(VI) 分析では検出限界が 30 mg/L と、実用的には困難なレベルのものであった。一方、ワックスプリンターによる μ PAD の修飾法は、紙の白色の部分を維持したまま流路の構築が可能である。そこで本研究では、ワックスプリンティング修飾法により作製した μ PAD による Cr(VI) の高感度定量法について検討を行った。

2. 実験

2.1 試薬

Cr(VI) 標準液 (1000 mg/L, 和光純薬工業製) を適宜希釈したものを用いた。1,5-ジフェニルカルバジド (DPC) は、ナカライテスク製のものを使用し、10 g/L

のアセトン溶液として用いた。塩酸は、和光純薬工業製のものを用い、純水で希釈し、0.1 mol/L のものを用いた。

2.2 μ PAD の作製

Fig.1 A に示す 4 チャンネル型の μ PAD を Microsoft Word によりデザインし、ワックスプリンター (Xerox, ColorQube 8580) を用いてクロマトろ紙 (Advantec, No.51B) に印刷した。印刷したろ紙を、120 °C にした乾燥器 (Advantec, FS-620) に 2 分間入れ、ワックスインクを融解することにより疎水性バリアを構築した (Fig.1 B)。

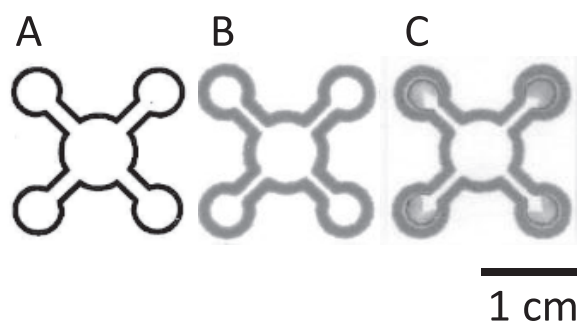


Fig.1 Photographs of the μ PADs.

A: after printing, B: after melting, C: after analysis.

2.3 μ PAD による Cr(VI) の分析手順

Fig.2 に修飾した μ PAD による Cr(VI) の分析手順を示す。修飾したろ紙の 4 隅の検出部に、マイクロピペットを用い、DPC 溶液 1 μ L、塩酸 0.5 μ L を滴下

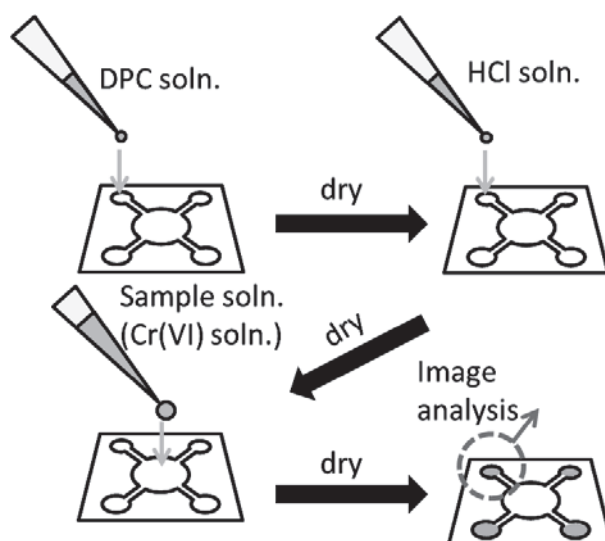


Fig.2 Analytical procedure.

し乾燥した。次に、Cr(VI) を含む試料溶液を中心の試料滴下部に滴下すると、試料溶液は 4 隅の検出部に浸透し、Cr(VI)-DPC 錯体が形成することで紫色に呈色する (Fig.1 C)。乾燥後の μ PAD をスキャナー (Epson, GT-S650) で撮り込み、呈色部の RGB 強度を画像処理ソフト ImageJ (NIH)¹³⁾ により解析した。なお、分析値は 4 回測定したものを平均し、その標準偏差を求めた。

3. 結果

3.1 画像取り込み方法の検討

呈色した μ PAD の画像を取得するため、コンパクトデジタルカメラ (Panasonic, DMC-LS80)、デジタル一眼レフカメラ (Nikon, D5100) 及びスキャナー (Epson, GT-S650) を用い比較を行った。なお、コンパクトデジタルカメラ及びデジタル一眼レフカメラに関しては、実験台で覆い等をせず、そのまま撮影したものと、撮影ボックス (シーフォース SEA FORCE, PX-260) 内で撮影したものについても検討した。

Table 1 Comparison of the slope and correlation coefficient for the calibration graph of each image capture.

Image capture	Slope		Correlation coefficient	
	Table ^c	Box ^d	Table	Box
Compact ^a	1.95	2.31	0.973	0.976
DSLR ^b	1.24	1.56	0.994	0.772
Scanner	3.39		0.983	

a. compact digital camera, b. digital single-lens reflex camera, capture condition: c. on the table without the cover, d. in the lighting box.

Cr(VI) 濃度、0, 0.5, 1, 5, 10 mg/L の溶液を試料溶液とし、2. 3 に記述した方法により呈色操作を行った。取り込んだ画像の呈色部を画像解析ソフトにより、RGB 強度で解析したところ、G 強度が最も強い応答を示した。したがって、G 強度を評価強度として選択した。一方、それぞれの画像取得方法を評価するため、ここでは各 Cr(VI) 濃度と画像解析から得られた G 強度をプロットし、感度の目安である検量線の傾き及び

強度 - 濃度の関係性の強弱を示す相関係数を調べた。その結果を Table 1 に示す。これよりコンパクトデジタルカメラ (Compact) 及び一眼レフデジタルカメラ (DSLR) は、実験台 (Table) での撮影よりもボックス (Box) 内での撮影の方が、検量線の傾きがやや大きい結果が得られた。これは外からの光の入り込み等の影響を受けず、呈色部の撮影が行えたためと考えられる。一方、相関係数に関しては 0.9 程度が得られているが、ボックスを使用した一眼レフデジタルカメラでの撮影は 0.772 と良い相関が得られなかった。一眼レフデジタルカメラは、撮影条件を設定できる項目が多く、最適化すれば感度・精度の改善がみられると考えられるが、今回の検討では、コンパクトデジタルカメラの方が良い結果となった。一方、スキャナー (Scanner) による取り込みは、カメラに比べて傾きが 1.5~2.7 倍大きく、感度に大きく影響を与えることが分かった。スキャナーは外界の光の影響を受けることなく画像を取り込むことができるため、より高感度な分析が可能となったと考えられる。今回使用したスキャナーは、PC に USB 接続することにより (バスパワー) 駆動するタイプであり、AC 100 V の電源を必要としないため、ノート PC などを利用すれば、屋外でも画像の取り込みを行うことが可能である。今回検討したものと異なる機種のカメラやスキャナーの使用による、強度 (感度) への影響があると考えられるが、試験紙上の分析とは関係ない位置に基準となる紫色で印字した箇所を設け、呈色部の強度との比をとることで (内標準法)、機種に依存しない分析が可能となると考えられる。以上の結果から、今後、高感度化のための画像の取り込みは、スキャナーを用いることとした。

3.2 滴下体積の検討

通常、分析における高感度化のためには、濃縮の手法が用いられる。例えば、Cr(VI) の濃縮法として溶媒抽出¹⁴⁾ やイオン交換樹脂を用いた方法¹⁵⁾ 及び共沈法¹⁶⁾ が報告されている。しかしながら、そのような前処理を行うことなく高感度化が可能となれば、操作が煩雑とならず、特別な試薬も必要としない簡便な手法となる。そこで、本研究では、 μ PAD に滴下する試料体積を増加させる単純な操作で、高感度化が可能か検討を行った。滴下体積による G 強度への影響について検討した結果を Fig. 3 に示す。なお、各強度は、ブランクの強度を差し引いた値、 ΔG としてプロットしている。これより、滴下体積の増加にともない、強度は緩

やかではあるが、増加していることがわかる。滴下体積の増加に伴い強度も向上するが、その分呈色反応終了までの時間も要する。したがって、ここでは、ばらつきも少なく、乾燥時間も適当な、滴下体積 $60 \mu\text{L}$ を選択した。

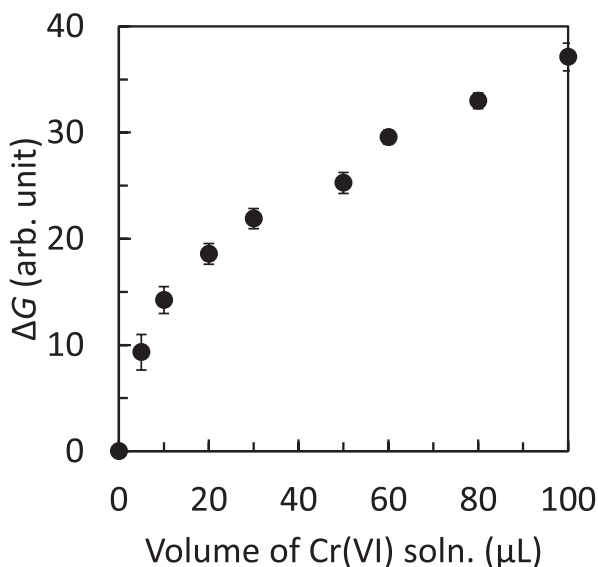


Fig.3 Effect of sample volume on ΔG .

3.3 検出限界の算出

3. 2で検討した結果から、Cr(VI)を含む試料溶液の滴下体積を $60 \mu\text{L}$ とし、作成した検量線を Fig.4 に示す。これより、 $100 \mu\text{g/L}$ までは良い直線性を示し、 $100 \mu\text{g/L}$ 以降はやや湾曲してくるものの、各 Cr(VI) 濃度において明瞭な強度差がみられた。これより、 $100 \mu\text{g/L}$ までの検量線 (Fig.4 インセット) の回帰線

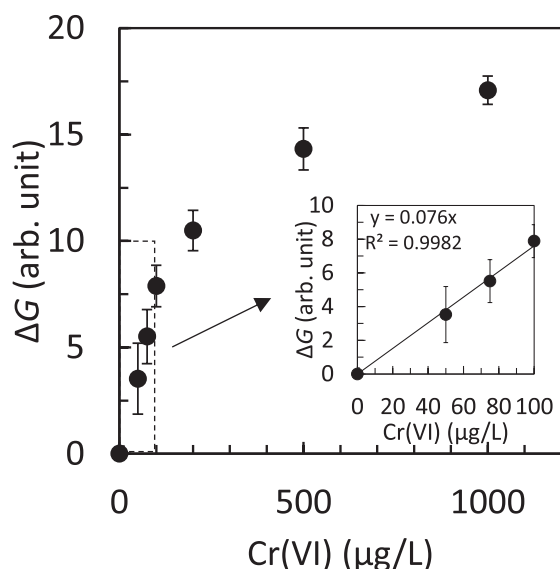


Fig.4 Calibration graph for Cr(VI).

を用い、ブランクの標準偏差の3倍の強度を与える Cr(VI) 濃度、すなわち検出限界を算出した。その結果、Cr(VI) の検出限界は、 $26.2 \mu\text{g/L}$ となり、以前に報告した検出限界 30 mg/L の1000倍感度が向上した。

4. 結論

本研究では μPAD を用いた Cr(VI) の高感度定量法について検討を行った。その結果、試料体積を $60 \mu\text{L}$ とすることで、検出限界 $26.2 \mu\text{g/L}$ が得られ、以前に報告した手法から1000倍感度が向上した。実用化には、実サンプル中に想定される共存成分の影響や、本分析試験紙及び他の分析法による実サンプル分析結果との比較等の検討を行う必要がある。本法は、濃縮などの前処理操作を必要とせず、試料溶液を滴下するだけで、簡便な Cr(VI) 高感度分析が可能である。分析機器を使用することなく分析が可能であるため、分析環境が十分でないオンサイトや開発途上国などでの活用が期待される。

謝 辞

本研究は山陽小野田市立山口東京理科大学地域卒業研究費及び山陽小野田市立山口東京理科大学研究推進機構の助成を受けたものです。ここに記して、関係者各位に深く謝意を表します。

参考文献

- 1) 古田早容：栄養の生化学：微量元素，月刊薬事，47, 83-89, 2005.
- 2) K. Yatera, Y. Morimoto, S. Ueno, S. Noguchi, T. Kawaguchi, F. Tanaka, H. Suzuki, T. Higashi: Cancer risks of hexavalent chromium in the respiratory tract, *J. Uoeh*, 40, 157-172, 2018.
- 3) A. Sai, K. Ohashi, K. Motojima, and K. Yamamoto: Adsorption behavior of chromium (III, VI) on activated carbon and oxine-impregnated activated carbon, *Bunseki Kagaku*, 31, E361-E366, 1982.
- 4) K. Pytlakowska, K. Kocot, M. Pilch, M. Zubko: Ultrasound-assisted dispersive micro-solid phase extraction using molybdenum disulfide supported on reduced graphene oxide for energy dispersive X-ray fluorescence spectrometric determination of chromium species in water, *Microchim. Acta*, 187, 542, 2020.

- 5) C. Cui, M. He, B. Chen, and B. Hua: Chitosan modified magnetic nanoparticles based solid phase extraction combined with ICP-OES for the speciation of Cr(III) and Cr(VI), *Anal. Methods*, 6, 8577-8583, 2014.
- 6) 渡辺邦洋, 石井 雄, 四反田功, 板垣昌幸: 4-メトキシクマリンによるクロム(VI)の化学発光定量及びアルカリ添加の効果, *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, 60, 585-591, 2011.
- 7) C. Pasquini and W. A. De Oliveira: Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia and phosphorus, *Anal. Chem.*, 57 2575-2579, 1985.
- 8) T. Ozer, C. McMahon, and C. S. Henry: Advances in paper-based analytical devices, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 13, 4.1-4.25, 2020.
- 9) H. Asano and Y. Shiraishi: Development of paper-based microfluidic analytical device for iron assay using photomask printed with 3D printer for fabrication of hydrophilic and hydrophobic zones on paper by photolithography, *Anal. Chim. Acta*, 883, 55-30 2015.
- 10) H. Asano, A. Akinobu, and Y. Shiraishi: Development of multichannel μ PAD using pH-responsive gold nanoparticles, *Bull. TUSY*, 1, 25-29, 2018.
- 11) H. Asano and Y. Shiraishi: Microfluidic paper-based analytical device for the determination of hexavalent chromium by photolithographic fabrication using a photomask printed with 3D printer, *Anal. Sci.*, 34, 71-74, 2018.
- 12) H. Asano, T. Maeda, and Y. Shiraishi: *Bunseki Kagaku*, 2021. (in press)
- 13) W. S. Rasband: ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.
- 14) 阿久津哲也, 清水得夫, 上原伸夫: in situ 抽出剤生成法を利用するマイクロ溶媒抽出法によるクロム(III)とクロム(VI)の分別定量, *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, 58, 693-591, 2009.
- 15) S. Matsuoka, Y. Tennichi, K. Takehara, K. Yoshimura: Flow analysis of micro amounts of chromium(III) and (VI) in natural water by solid phase spectrophotometry using diphenylcarbazide, *Analyst*, 124, 787-791, 1999.
- 16) 渡辺邦洋, 東條美由紀, 板垣昌幸: 金属水酸化物共沈を用いるクロム(VI)のフローインジェクション分析, *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, 55, 781-786, 2006.