

# 博士学位論文

(内容の要旨及び論文審査の結果の要旨)

氏名 Ayala Quezada, Alejandro  
学位の種類 博士 (工学)  
学位記番号 博 甲 第 47 号  
学位授与 平成 27 年 9 月 10 日  
学位授与条件 学位規定第 3 条第 3 項該当  
論文題目 **Advanced Flow Analysis Systems for Sensitive Automated Chemical Analysis**  
(高感度な自動化学分析のための高性能流れ分析システムの開発)  
論文審査委員 (主査) 教授 手嶋 紀雄<sup>1</sup>  
(審査委員) 名誉教授 酒井 忠雄<sup>1</sup> 教授 井上 眞一<sup>1</sup> 講師 村上 博哉<sup>1</sup>

## 論文内容の要旨

### Advanced Flow Analysis Systems for Sensitive Automated Chemical Analysis

(高感度な自動化学分析のための高性能流れ分析システムの開発)

水は我々に最も身近な物質のひとつであり、飲料水や食物として摂取され、生命活動を根底から支えている。また工業分野では高品質な製品の製造に用いられ、社会活動を営むうえにも不可欠なものである。したがって水中の環境・生体負荷物質の化学分析の重要性は言をまたない。しかし化学分析による水質評価手法には、試薬や試料を大量に消費し、熟練が必要な要素も多いことから、少試薬・少試料化、高感度化、スキルフリー化や自動化が強く望まれている。本研究はこれらニーズに対応すべく、高感度な自動化された化学分析を実現する高性能な流れ分析システムを確立するものである。

流れ分析法とは、内径 0.5~1.0 mm 程度の樹脂製細管(通常はテフロン管)内の流れの中で、試料溶液と試薬溶液とを合流させて化学反応を行わせた後、下流に設置した検出器で分析目的成分を検出して定量する分析方法である。代表的な流れ分析法として、フローインジェクション分析(Flow Injection Analysis, FIA)法、シーケンシャルインジェクション分析(Sequential Injection Analysis, SIA)法があげられる。これらは、分析の迅速化、少試料・少試薬化、高い再現性などの点

で、従来のバッチマニュアル法による化学分析よりも利便性の高い特長を有しているが、さらに高い分析性能を付加させる必要がある。本研究では環境・生体負荷物質としての亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、硫酸イオン、鉄、バナジウム、カドミウム、鉛を高選択・高感度かつ自動的に化学分析するための、新奇的な流れ分析システムを構築した。これらの研究成果を以下に記述する。

第 1 章は序論である。細管内という微小場で化学分析を行う FIA 法や SIA 法をはじめとする各種流れ分析法の開発の歴史的背景について述べた。また、FIA や SIA の特長をさらに進化させたストップ・イン・ループ / フロー分析(Stopped-in-Loop / Flow Analysis, SILFA)法、同時注入迅速混合フロー分析(Simultaneous Injection Effective Mixing Flow Analysis, SIEMA)法の特長を解説し、第 2 章以降の内容を概説した。

第 2 章では、飲料水、排水中の亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、硫酸イオンの SIA による自動分析システムを開発した。窒素は生体の必須元素であるが、亜硝酸態窒素および硝酸態窒素は健康影響が認められている。硝酸態窒素を含む肥料等により汚染された地下水や井戸水を飲用すると、腸内細菌によって硝酸態窒素が還元され亜硝酸態窒素に変化する。体内に取り込まれた亜硝酸イオンは血液中のヘモグロビンと反応して酸素運搬ができないメトヘモグロビンとなり、特に乳幼児にメトヘモグロビン症を引き起こ

す。したがってこれまでの水道水質基準では、亜硝酸態窒素と硝酸態窒素の合計量が 10 mg/L 以下と定められていた。しかし、亜硝酸態窒素がかなり低濃度で影響を及ぼすことが明らかになり、平成 26 年 4 月 1 日に水質基準に関する省令に亜硝酸態窒素が単独で新たに追加された。その基準値は 0.04 mg/L である。また、給水装置の構造及び材質の基準に関する省令ではその基準値はさらに低濃度の 0.004 mg/L であるため、簡便で高感度な分析法の開発が待たれる。一方、飲用水に硫酸イオンが多量に含まれると水の味が悪くなる。硫酸イオンに関する日本の水質基準値はないが、WHO のガイドライン値は 250 mg/L に設定されている。これまで、これら 3 種の水質監視項目を同時に計測する SIA システムは報告されていない。そこで、酸性溶液中における亜硝酸イオン/スルファニルアミド/*N*-1-ナフチルエチレンジアミンによるアゾ色素生成反応、および、硫酸バリウムによる白濁を利用する比濁法を SIA システムに導入して 3 成分の自動化学分析法を開発した。

第 3 章ではストップ・イン・ループ/フロー分 (SILFA) 法による飲料水中の微量バナジウムと鉄の接触分析法を開発した。接触分析とは、反応速度分析法のひとつであり、溶液中の均一触媒反応における触媒自身を分析対象物とするため、化学量論反応ではなし得ない高感度分析 (サブ  $\mu\text{g/L}$  ~  $\mu\text{g/L}$  の金属イオン) が可能となる。近年、バナジウムはインスリン作用を有することから抗糖尿病薬として注目される元素である。このため、地下水を原水とするバナジウム含有の飲料水が市販されている。また生体にとって鉄が必須元素であることは周知の事実であり、健康増進を謳う飲料水やサプリメント錠剤を手にすることができる。しかし、過剰な鉄の蓄積が 2 型糖尿病の発症リスクを高めるとの報告もある。従って飲料水中の両元素の監視は極めて重要である。そこで以下の接触反応を SILFA システムに導入した。*p*-アニシジンは  $\text{KBrO}_3$  により酸化発色 (510 nm) する。この発色反応がサブ  $\mu\text{g/L}$  レベルのバナジウムによって加速される。またバナジウムの接触反応はタイロンによって活性化された。一方 *p*-アニシジンは  $\text{H}_2\text{O}_2$  によっても酸化発色 (510 nm) し、この反応が  $\mu\text{g/L}$  レベルの鉄によって加速される。この接触反応は 1,10-フェナントロリン (phen) によって活性化されることが見いだされた。

第 4 章では共同研究者により最近報告された同時注入迅速混合フロー分析 (SIEMA) 法と従来の FIA 法との分析性能の比較を詳細に検討した。比較に用いた化学反応は、水溶性キ

レート試薬である 5-Br-PSAA とパラジウムとの錯形成による発色反応である。SIEMA 法は、FIA 法に比べ試薬消費量を 1/5 に削減できることが判明した。

第 5 章では、ストップ・イン・ループ/フロー分析 (SILFA) 法と同時注入迅速混合フロー分析 (SIEMA) 法とをハイブリッド化した新奇なフローシステムによる飲料水中の V と Fe の接触分析法を開発した。SILFA 法は、六方バルブ上に設置したループ内に反応溶液を隔離することにより、流れが止まった状態で反応を促進させ、この間、ポンプを止めて試薬を流さない流れ分析技術である。この SILFA 法は、加熱を必要とする比較的遅い接触反応に適しており、前述の通り第 3 章において SILFA システムによるバナジウムと鉄の接触分析法を開発した。しかし、1 回の測定に用いる試薬溶液と試料溶液の合計体積は約 10 mL であり、更なる削減が望まれた。そこで、第 4 章において明らかにされた SIEMA 法がもつ試薬消費量削減の特長を活用した。すなわち、SIEMA 法と SILFA 法を結合させたハイブリッド流れ分析システムを構築し、少試薬化・少試料化を図った。以下にハイブリッド流れ分析法の操作を述べる。まず SIEMA モードにより、バナジウム定量用の試薬溶液として「*p*-アニシジン+タイロン+ニリン酸 (鉄の隠蔽剤)」混合溶液と  $\text{KBrO}_3$  溶液を合計 400  $\mu\text{L}$  吸引・吐出し、100  $\mu\text{L}$  の試料溶液と混ぜ合わせる。この反応溶液を SILFA システム内の加熱されたループに充填し、反応促進後、検出器に導入し、吸光度を測定した。つまり、このハイブリッド流れ分析システムにおいて、1 回の測定に用いられる試薬と試料の合計体積は 500  $\mu\text{L}$  であり、第 3 章の方法において必要であった 10 mL から 1/20 に削減することができた。一方鉄定量用の試薬として「*p*-アニシジン+phen」混合溶液と  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液を用いることで、バナジウム共存下であっても選択的に鉄の定量を行うことができた。検出限界はそれぞれ、0.67  $\mu\text{g V/L}$ 、2.20  $\mu\text{g Fe/L}$  と高感度である。本法を市販飲料水に応用し、良好な結果を得た。

第 6 章では、通常の SIA 装置に六方スイッチングバルブを追加することにより、試料の前濃縮機能をもたせた高機能 SIA システムを開発し、尿中の超微量金属分析に応用した。2013 年 9 月に JIS K 0102「工場排水試験方法」が改正され、キレート樹脂固相抽出法が金属イオンの各種機器分析の前処理技術として導入された。しかし、その操作はバッチマニュアル式であることが多く、樹脂の使用量も多い。本研究では高機能 SIA システムに少量のキレート樹脂を充填したミニカラムを設

置し、黒鉛炉原子吸光光度計と結合することにより、尿に代謝された $\mu\text{g/L}$  レベルのバナジウムや鉛、 $\text{ng/L}$  レベルのカドミウムのオンライン自動前処理/定量法を確立した。

第7章は結論として博士論文全体を総括した。本研究で開発された環境・生体負荷物質を監視するための高機能な流れ分析システムは、従来の水環境の化学分析技術に比べて、試薬消費量が削減され、感度および自動化の面においても優れている。達成された水質評価手法の技術革新は、今後、現行のJIS法や公定法の改訂にも大きく寄与できるものと期待され、安全・安心かつ豊かで質の高い国民生活の実現に貢献できるものと考えている。

#### 論文審査結果の要旨

Alejandro Ayala Quezada 君の研究は、水試料中の環境・生体負荷物質を高選択・高感度かつ自動的に化学分析するための、新奇な高性能流れ分析システムを確立したものである。流れ分析法とは、内径 0.5~1.0 mm 程度の樹脂製細管（通常はテフロン管）内の流れの中で、試料溶液と試薬溶液とを合流させて化学反応を行わせた後、下流に設置した検出器で分析目的成分を検出して定量する分析方法である。代表的な流れ分析法として、フローインジェクション分析 (Flow Injection Analysis, FIA) 法、シーケンシャルインジェクション分析 (Sequential Injection Analysis, SIA) 法があげられる。これらの分析法は、分析の迅速化、少試料・少試薬化、高い再現性などの点で、従来のバッチマニュアル法による化学分析よりも利便性の高い特徴を有している。しかし、最近の研究によって環境負荷物質の毒性がより詳細に明らかにされる中で、環境基準値がより低濃度化している。したがって、これらの社会的なニーズに対応すべく、既存の流れ分析法にさらに高い分析性能を付加させる必要がある。そこで本研究では、環境・生体負荷物質としての亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、硫酸イオン、鉄、バナジウム、カドミウム、鉛を自動分析する高性能流れ分析システムを開発した。これらの研究成果は以下の通りである。

第1章は序論として研究背景が記述されている。FIA や SIA の特徴を述べ、これらの利点をさらに進化させたストップ・イン・ループ/フロー分析 (Stopped-in-Loop/Flow Analysis, SILFA) 法、同時注入迅速混合フロー分析 (Simultaneous Injection Effective Mixing Flow Analysis, SIEMA) 法の特徴を解説し、第2章以降の内容

が概説されている。

第2章では、飲料水、排水中の亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、硫酸イオンの SIA による自動分析システムを開発した。窒素は生体の必須元素であるが、亜硝酸態窒素および硝酸態窒素は健康影響が認められている。硝酸態窒素を含む肥料により汚染された地下水や井戸水を飲用すると、腸内細菌によって硝酸態窒素が還元され亜硝酸態窒素に変化する。体内に取り込まれた亜硝酸イオンは血液中のヘモグロビンと反応して酸素運搬ができないメトヘモグロビンとなり、特に乳幼児にメトヘモグロビン症を引き起こす。したがってこれまでの水道水質基準 (亜硝酸態窒素と硝酸態窒素の合計量で 10 mg/L 以下) よりもかなり低濃度 (亜硝酸態窒素で 0.04 mg/L 以下) の基準値が昨年に設定された。一方、飲用水に硫酸イオンが多量に含まれると水の味が悪くなる。硫酸イオンに関する日本の水質基準値はないが、WHO のガイドライン値は 250 mg/L に設定されている。そこで、酸性溶液中における亜硝酸イオン/スルファニルアミド/N-1-ナフチルエチレンジアミンによるアゾ色素生成反応、および、硫酸バリウムによる白濁を利用する比濁法を SIA システムに導入して3成分の自動化学分析法を開発した。この成果は Elsevier 発刊の Microchemical Journal 誌に掲載されている。

第3章ではストップ・イン・ループ/フロー分析 (SILFA) 法による飲料水中の微量バナジウムと鉄の接触分析法を開発した。接触分析とは、反応速度分析法のひとつであり、溶液中の均一触媒反応における触媒自身を分析対象物とするため、化学量論反応ではなし得ない高感度分析 (サブ $\mu\text{g/L}$ ~ $\mu\text{g/L}$  の金属イオン) が可能となる。近年、バナジウムはインスリン作用を有することから抗糖尿病薬として注目される元素である。このため、地下水を原水とするバナジウム含有の飲料水が市販されている。また生体にとって鉄が必須元素であることは周知の事実であり、健康増進を謳う飲料水やサプリメント錠剤を手にすることができる。しかし、過剰な鉄の蓄積が2型糖尿病の発症リスクを高めるとの報告もある。従って飲料水中の両元素の監視は極めて重要である。そこで以下の接触反応を SILFA システムに導入し、飲料水質分析に適用した。この成果は、Elsevier 発刊の Talanta 誌に掲載された。

第4章では同時注入迅速混合フロー分析 (SIEMA) 法と従来の FIA 法との分析性能の比較を詳細に検討した。比較に用いた化学反応は、水溶性キレート試薬である 5-Br-PSAA とパラジウムとの錯形成による発色反応である。SIEMA 法は、FIA

法に比べ試薬消費量を 1/5 に削減できることを明らかとした。この成果は、世界唯一の流れ分析の専門誌である Journal of Flow Injection Analysis 誌に掲載された。

第 5 章では、ストップイン-ループ/フロー分析 (SILFA) 法と同時注入迅速混合フロー分析 (SIEMA) 法とをハイブリッド化した新奇なフローシステムによる飲料水中の V と Fe の接触分析法を開発した。SILFA 法は、六方バルブ上に設置したループ内に反応溶液を隔離することにより、流れが止まった状態で反応を促進させ、この間、ポンプを止めて試薬を流さない流れ分析技術である。この SILFA 法は、加熱を必要とする比較的遅い接触反応に適しており、前述の通り第 3 章において SILFA システムによるバナジウムと鉄の接触分析法を開発した。しかし、1 回の測定に用いる試薬溶液と試料溶液の合計体積は約 10 mL であり、更なる削減が望まれた。そこで、第 4 章において明らかにされた SIEMA 法がもつ試薬消費量削減の特長を活用した。すなわち、SIEMA 法と SILFA 法を結合させたハイブリッド流れ分析システムを構築し、少試薬化・少試料化を図った。その結果、このハイブリッド流れ分析システムにおいて、1 回の測定に用いられる試薬と試料の合計体積は 500  $\mu$ L であり、第 3 章の方法において必要であった 10 mL から 1/20 に削減することができた。この成果は、日本分析化学会が発刊する国際誌である Analytical Sciences に掲載予定である (2015 年 10 月号)。

第 6 章では、通常の SIA 装置に六方スイッチングバルブを追加することにより、試料の前濃縮機能をもたせた高機能 SIA システムを開発し、尿中の超微量金属分析に応用した。2013 年 9 月に JIS K 0102「工場排水試験方法」が改正され、キレート樹脂固相抽出法が金属イオンの各種機器分析の前処理技術として導入された。しかし、その操作はバッチマニュアル式であることが多く、樹脂の使用量も多い。本研究では高機能 SIA システムに少量のキレート樹脂を充填したミニカラムを設置し、黒鉛炉原子吸光度計と結合することにより、尿に代謝された  $\mu$ g/L レベルのバナジウムや鉛、ng/L レベルのカドミウムのオンライン自動前処理/定量法を確立した。キレート樹脂 40 mg をミニカラム (内径 2.6 mm  $\times$  40 mm) に詰め、これを SIA システムの六方スイッチングバルブ上に設置した。八方セクションバルブの 4 つポートには、空気、酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液、V-Cd-Pb 混合標準液 (あるいは試料溶液)、溶離液 (1 M 硝酸) をセットした。シリンジポンプとこれら 2 つのバルブを PC で制御しながら、カラムのコンディショニング、金属標準液 (あるいは試料溶液) のミニカラムへの導入、ミニカラムからの溶離を行い、溶離液の一部を黒煙炉へ導入し測定を行っ

た。これらの操作は完全に自動化されている。本法の定量感度は、ICP-MS に匹敵する。この成果は Analytical Sciences 誌に掲載されている。

第 7 章は結論として博士論文全体を総括した。本研究で開発された環境・生体負荷物質を監視するための高機能な流れ分析システムは、従来の水環境の化学分析技術に比べて、試薬消費量が削減され、感度および自動化の面においても優れている。達成された水質評価手法の技術革新は、今後、現行の JIS 法や公定法の改訂にも大きく寄与できるものと期待される。よって本博士論文は、博士 (工学) の学位のレベルを十分に満たしているものと判定された。