

2024. 3. 31

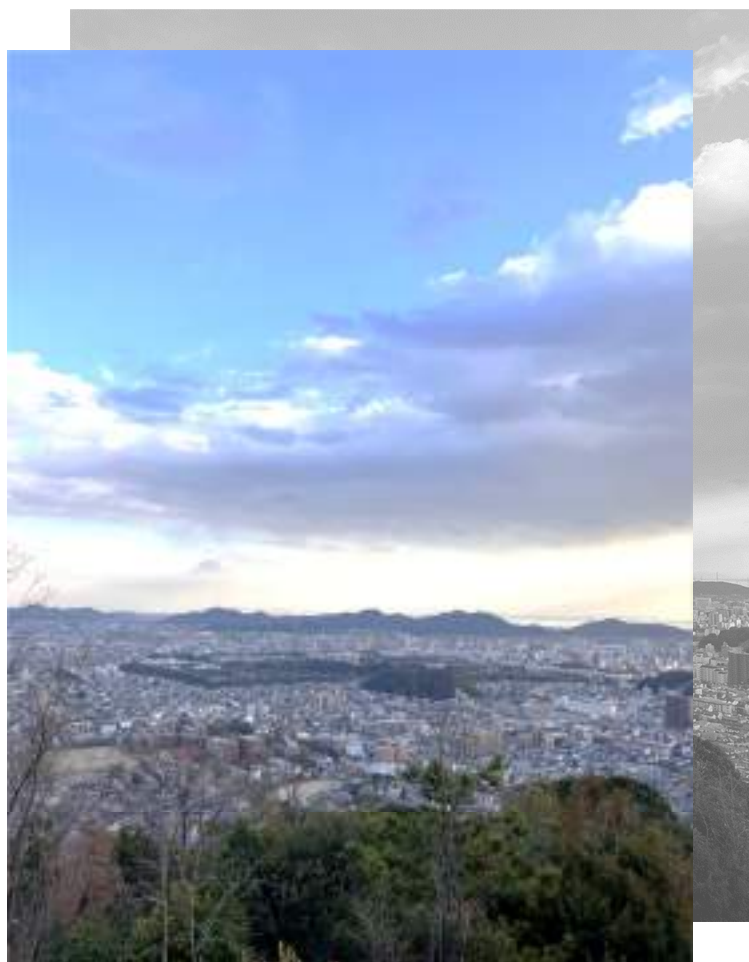
No. 2

技術開発研究所報

掲載内容

市販のヒ素試験紙の光学読み取りによる微量ヒ素の定量分析

高田愛・家永陽二郎・和田信一郎



技術開発研究所 発行

市販のヒ素試験紙の光学読み取りによる 微量ヒ素の定量分析

高田愛¹・家永陽二郎¹・和田信一郎¹

¹株式会社アステック 技術開発研究所（兵庫県姫路市実法寺 105）

グートツァイト法を利用してヒ素を定量するための市販の試験紙をフラットベッドスキャナで読み取り、画像解析ソフトを利用して色をRGB値として数値化することによりヒ素の定量を行った。発色した試験紙は余剰の水をろ紙で除去した後暗所で温風乾燥することにより約1週間は色が安定した。ヒ素濃度0~0.025 mg/Lの間ではヒ素濃度とB値の間に直線関係があった。また0.01~0.1 mg/Lの間ではヒ素濃度の対数値とB値の間に直線関係があった。ヒ素濃度0.1~0.5 mg/Lの間ではB値の変化は小さかったが、ヒ素濃度の対数値とR値の間に直線関係がみられた。さらにヒ素濃度が0.01~0.5 mg/Lの範囲では、濃度の対数値はR値、G値、B値を変数とする回帰式でもよく近似できた。これらの関係を用いてヒ素含有水のヒ素濃度を定量し、公定法による値と比較した。

Key words: arsenic, test kit, soil pollution, water pollution

1. まえがき

ヒ素は動物の必須元素でもあるが、その必要量はごくわずかである。この必要量を超えて摂取すると、多量摂取の場合には消化管の急性障害による死亡、微量の長期摂取の場合には皮膚がんやボーエン病などを引き起こす¹⁾。そのため、世界保健機構(WHO)は飲料水のヒ素に関する水質基準を0.01 mg/Lと定めている。日本においても水道水質基準は0.01 mg/Lと定められており、一律排水基準は0.1 mg/Lと定められている。また土壤汚染対策法における溶出量基準も0.01 mg/Lと定められている。

水質基準前後の濃度で水に溶存するヒ素は、ICP発光分光分析、ICP質量分析、水素化物発生原子吸光分析、電気加熱原子吸光分析などによって定量することができ、定量操作は確立されている。しかし、これらの装置は比較的大型かつ高価であり利用できる環境は制限される。ヒ素汚染水の野外調査、仮設のヒ素汚染水処理施設の運転管理などにおいては安価な可搬型装置や薬品と簡単な器具を用いた定量法が必要である。

水に溶存するヒ素はヒ酸または亜ヒ酸として存在することが多い。この形態のヒ素は強力な還元剤を作用させるとアルシン(AsH₃)として揮散する。アルシンは臭化水銀と反応して黄褐色の臭化ヒ素水銀を生成する。この呈色反応を利用することにより検水中の共存元素の妨害を受けずに微量のヒ素を目視検出することができる(グートツァイト法)。この原理を利用したガラス製測定器具²⁾や臭化水銀を含浸させた試験紙キット³⁾などがすでに市販されて利用

されている。

最近では、ヒ素と結合する化合物で表面修飾した金や銀のナノ粒子がヒ素の存在下で凝集する現象を利用した目視検出法が報告されている^{4,5,6,7)}。金や銀のナノ粒子が表面プラズモン共鳴により示す可視部の吸収スペクトルが、凝集の程度に応じて変化することを利用することにより目視により微量のヒ素を検出することができる。この方法は、目視による検出も可能であるし、分光光度計を用いると定量も可能である。可搬型の分光光度計を用いるなら、野外での利用も可能である。ただ、凝集反応を利用しているため、共存元素の干渉は無視できず、検液の塩濃度が高い場合にはそれによる誤差を生ずることもある(和田、未発表)。

検液の塩濃度や共存元素の影響を受けずに溶存ヒ素を検出する方法としては、試験紙を用いたグートツァイト法は非常に優れている。この方法で水中のヒ素を定量するにはあらかじめ色見本を作成しておき、着色した試験紙や溶液の色を見本色と比較する。この方法で、検液のヒ素濃度が基準を超過しているかどうかは比較的容易に判断できる。しかし、濃度の数値化は難しい。この欠点は、試験紙の発色をスキャナやスマートフォンなどで読み取り、画像処理することにより克服できる⁸⁾。この研究では、市販の試験紙と試験キットを利用し、試験紙の発色程度を数値化することによって環境基準程度の濃度のヒ素を定量分析するための方法を検討した。

2. 試料と実験方法

2.1. 試験紙と試験キット

試験紙および試験キットとしては、Merck社製のエムクアントヒ素テスト紙 (As MQuant 117927)、およびそれに対応した反応容器と還元剤などの試薬を用いた。検水 60 mL を専用容器に取り、硫化物を除去するため、添付の過マンガン酸カリウム溶液 2 滴を加えて混合した。さらに過剰の過マンガン酸イオンを除去するため、添付の試薬を添加して混合した。次いで、ヒ酸および亜ヒ酸を還元してアルシン (AsH_3) にするための金属粉末試薬を添付のスプーンで添加した。ただちに、専用容器の蓋上部から試験紙を挿入して所定時間反応させた。

検水にヒ素が含まれる場合、揮散したアルシンは試験紙に含まれる臭化水銀と反応し、ヒ化水素臭化水銀およびヒ化臭化水銀を生成し、試験紙は褐変した。

2.2. 試験紙の読取りと定量の基本操作

反応後の試験紙を専用容器から取り出し、先端を水で洗浄後、ろ紙にあてて余分な水分を除去し、デジタルカラー複合機 (RICOH MP C4503) のスキャン機能を利用して 600 dpi の JPEG 画像として保存した。スキャンするときには、図 1 に示すように試験紙を黒色の台紙に挟んで原稿台に設置した。原稿の種類はフルカラーの印画紙写真とした。



図 1. 黒色台紙に挟んだ試験紙。

画像の数値化のためには、GNU GPL の下で配布されている画像編集ソフトウェア GIMP を用いた。保存した画像を GIMP から開き、ツールボックスから矩形選択を選び、試験紙の呈色部分のほぼ全体を含む 135×135 ピクセルの部分を選択した。ヒストグラムのチャンネルから B (青) または R (赤) を選択し、選択部分の値の平均の値を記録した。

以上の操作を、標準液を用いて発色させた試験紙および検液を用いて発色させた試験紙に対して行った。標準液の濃度と平均 B 値または R 値をプロット

して検量線を作成し、この検量線を用いて検液の B 値または R 値から濃度を計算した。

読取りや検量線作成のための最適条件を求めるため、上述の基本操作に従って、スキヤナの安定性、試験紙の乾燥の有無、乾燥後の放置時間の影響について検討した。そのために行った実験手順の詳細は次節において結果とともに述べる。

2.3. 実汚染水への適用

この研究の方法を用いてくつかのヒ素含有水のヒ素濃度の定量を行い、公定法による濃度と比較した。

3. 結果と考察

3.1. 読取り値の安定性

まず、読取りに使用したスキヤナの安定性について検討した。ヒ素濃度 0 mg/L、0.01 mg/L および 0.1 mg/L の標準液を用いて試験紙を発色させ、水で洗浄後にろ紙で余分な水分を除去したのち前述の方法に従って B 値を読み取った。結果を表 1 に示す。

表 1. スキヤナの立ち上げ後の時間と読取り値の関係。

立ち上げ後 時間/h	標準液ヒ素濃度/(mg/L)		
	0	0.01	0.1
0	1.000	0.996	0.617
4	1.000	0.996	0.617
12	1.000	0.996	0.619

どの濃度においても、装置の立ち上げ直後に測定した場合でも、立ち上げ後 4 時間ないし 12 時間経過後に測定した場合でも読みとり値にはほとんど変化がなかった。なお、通常 B 値などは 0 から 255 までの整数値として表示されるが、使用した版の GIMP ではこれを 255 で除した小数値として表示されることになっていたので、表 1 だけでなく、この報告ではこの小数値を用いている。

次に、発色させた試験紙の色の安定性について検討した。ヒ素濃度 0.01 mg/L および 0.1 mg/L の標準液を用いて試験紙を発色させ水で洗浄し、ろ紙を用いて過剰の水分を除去した後に読取りを行った。また、同じ試験紙をデシケータ中に入れ、室温で 20～79 時間静置し、所定時間経過後に再読取りを行った。結果を図 2 に示す。

試験紙の B 値は発色直後から約 24 時間までの間は徐々に増加した。しかし、24 時間から 79 時間までの間の変化は非常に小さかった。最初の読取り時には試験紙は湿潤状態であったが、デシケータ中に保管したこともあり 24 時間後には乾燥していた。発

色直後と乾燥後の値との差は、試験紙内で生成したヒ素臭化水銀の量や性質の変化によるというより試験紙の水分含量の変化にともなう光の反射や吸収特性の変化によるのではないかと考えられる。

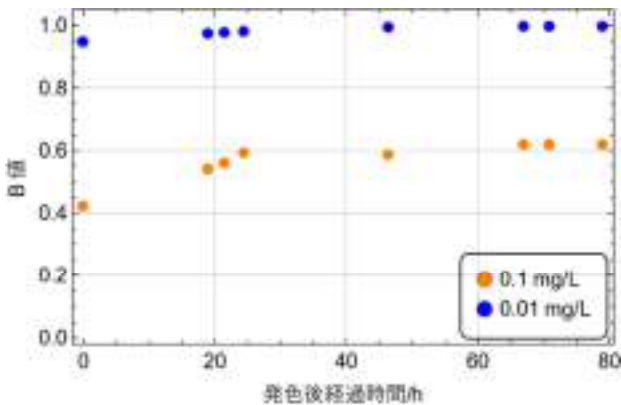


図2. 読取り値に対する静置時間の影響.

この実験の結果から、発色直後に定量したい場合には、検液と同時に標準液を用いた発色操作も行って同じ条件で読み取った両者の結果を比較する必要があると考えられる。発色した試験紙は少なくとも79時間は安定であるので、乾燥後に測定する場合には事前（例えば前日）に標準液を用いて発色させて乾燥後に読み取った標準液のデータを用いて検量線を作成しても良いと考えられる。

以上の結果から、乾燥させた試験紙の色はかなり長期間安定であることがわかった。ただ、室温で読取り値が安定するまでの乾燥には、その時点での湿度や温度にもよるが少なくとも24時間程度を要する（図2）。そこで、温風による乾燥の効果を調べた。ヒ素濃度0.005 mg/L～0.5 mg/Lの標準液を用いて発色させた試験紙をろ紙による水分除去の後でいったん読取り、食器乾燥機中で30分間温風乾燥を行った後再読取りを行った。結果は図3に示す。

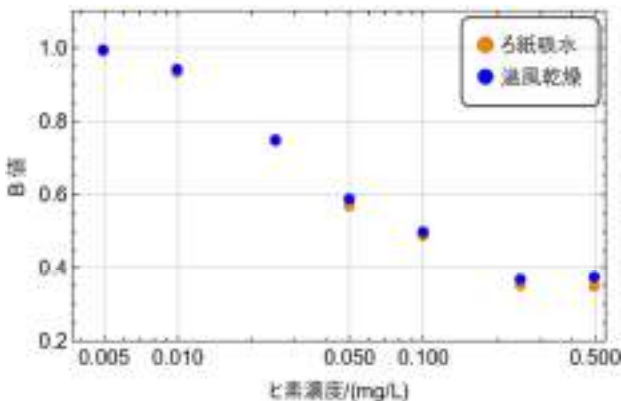


図3. 食器乾燥機による温風乾燥前後のB値.

なお、この図および以下の同様の図においては、横軸（ヒ素濃度）は対数表示とした。線形表示では0.005 mg/Lのプロットと0.01 mg/Lのプロットが識別しづらいからである。

どの濃度においても温風乾燥によりB値が増加する傾向がみられた。増加割合は濃度が高いほど顕著であった。この結果は、デシケータ中で室温乾燥した場合の傾向（図2）と基本的には同様であった。ただし、ヒ素濃度が0.1 mg/Lの場合、デシケータ中で24時間室温乾燥した場合のB値の増加が約0.2であったのに対し、温風乾燥した場合の変化は0.02程度であった（図3）。

次に、温風乾燥した試験紙の安定性について試験した。ヒ素濃度0.005 mg/L～0.5 mg/Lの標準液を用いて試験紙を発色させた後に水で洗浄し、ろ紙で過剰の水分を除去した後食器乾燥機中で30分間温風乾燥した。その後デシケータ中に保管し、一定時間ごとに読取りを行った。もう1組の試験紙を用いて同様の操作によって発色および乾燥を行った後、遮光したデシケータ中に保管し、こちらも一定時間ごとに読取りを行った。結果は図4に示す。上図が遮光することなく保管した場合、下図が遮光して保管した場合の結果である。

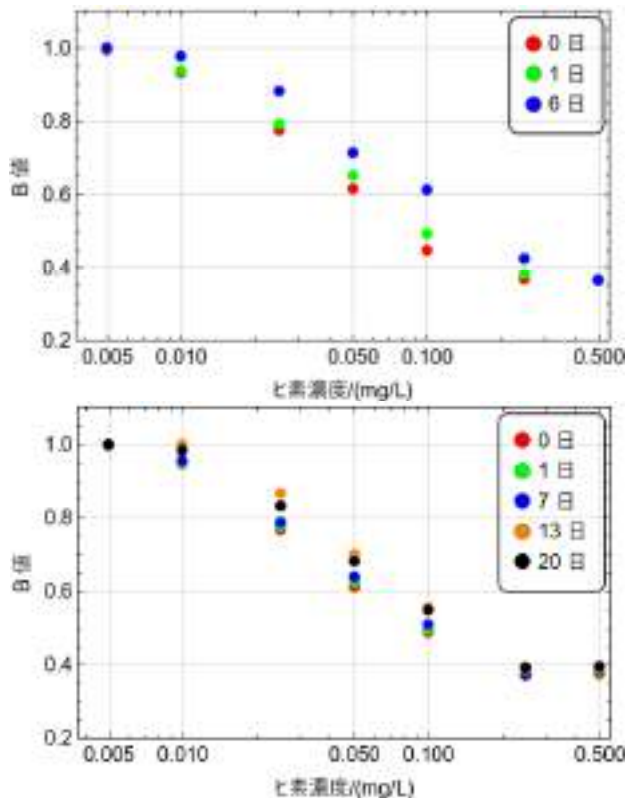


図4. 温風乾燥した試験紙の保管時の安定性に対する遮光の効果. 上: 遮光なし, 下: 遮光して保管.

温風乾燥後遮光なしで保管した試験紙の B 値は 1 日後には明らかに上昇し、6 日後にはさらに上昇した。一方、遮光条件で保管したものは、7 日後までは読みとり値の変化は小さかった。しかし、それを超えると B 値は上昇し、13 日後には明らかに増加し、20 日後にはさらに増加した。製品の取扱説明書によれば、発色後の試験紙を水で洗浄すれば色は変化しないと記載されているが、これは永遠に変化しないという意味ではなく、少なくとも数日間程度は変化しないという意味であると解するべきであろう。

発色させて乾燥した試験紙の色が非常に長期間安定なのであれば、標準液を用いて発色させた試験紙を乾燥させて遮光環境で保管しておき、検液で発色させた試験紙と並べてスキャンし、両者の比較により定量することが可能である。この方法は、同一のスキャナが利用できない場合や、スキャナの代わりにスマートフォンを利用するような場合には有用であると考えられる。しかしこの研究における実験結果によれば、色の変化が無視できる保管期間は 1 週間程度と考えられ、安定性には限度があった。ロットの異なる試験紙間の発色の違いもありうることも考慮するなら、標準液で発色させた試験紙を長期間、繰り返し利用することは避けた方が良く考えられる。

常に同一のスキャナを用いることができる場合でも、保管した（標準液で発色させた）試験紙を 1 週間を超えて再利用するよりも、その試験紙の過去の読取り結果を参照する方が合理的と考えられる。いうまでもないが最善の方法は、測定のために標準溶液を用いて発色させた試験紙の読取り結果と比較することであろう。

3.2. 検量線

図 5 には、同一の標準液を用いて別の日に作成した検量線を重ねて表示した。いずれも前述のとおり、発色させた後に水で洗浄し、ろ紙を用いて過剰の水分を除去した後食器乾燥機中で 30 分間温風乾燥後に読取りを行ったものである。また、使用した試験紙は同一ロットのものであった。

ヒ素濃度が 0.005 mg/L, 0.01 mg/L, 0.025 mg/L, 0.05 mg/L, 0.1 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L に対する測定 B 値の変動係数はそれぞれ、0.00209, 0.01151, 0.01717, 0.02475, 0.06670, 0.02546, 0.03278 であった。ヒ素濃度が 0.005 mg/L から 0.1 mg/L までは系統的に変動係数が大きくなり、それより高濃度ではまた小さくなった。変動の理由は明らかではないが、ヒ素濃度が 0.1 mg/L の場合の変動係数が 0.05 を超え

ることから、定量分析のためには毎回検量線を作成することが好ましいと考えられる。

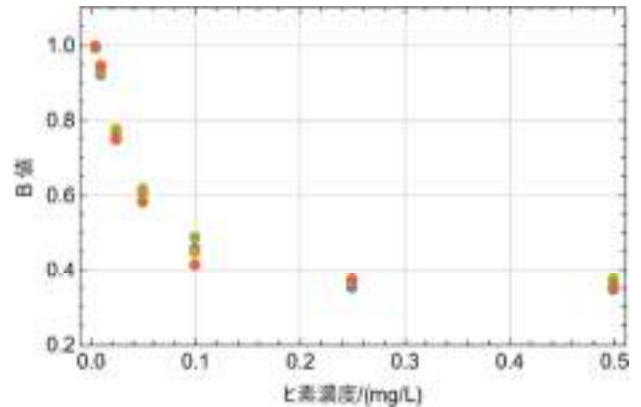


図 5. 異なる日に作成した検量線.

ヒ素濃度 0 mg/L から 0.5 mg/L の全範囲では、ヒ素濃度と B 値の関係は直線的ではなかった。またヒ素濃度が 0.1 mg/L 以上の場合、特に 0.25 mg/L 以上の場合には B 値の変化が小さく、この検量線を用いた定量は難しいと考えられた。

ヒ素濃度が 0.1 mg/L 以下の場合には、ヒ素濃度の変化に伴う B 値の変化は定量に十分なほどの大きさであった。ヒ素濃度が 0 mg/L から 0.025 mg/L の範囲では B 値とヒ素濃度の関係はほぼ直線的であったので、検量線の直線近似によって定量が可能と考えられた。一方、0 mg/L から 0.1 mg/L の間では直線近似は難しいと考えられた。

図 6 には濃度軸を対数表示にした検量線を示す。どの日に作成したものでも、濃度範囲が 0.01 mg/L から 0.1 mg/L の範囲では直線であった。したがってこの濃度範囲では、濃度軸を対数表示にした検量線の直線近似、つまり

$$B \text{ 値} = a \times \log(\text{ヒ素濃度}) + b \quad (1)$$

という形の式を当てはめることにより定量が可能である。

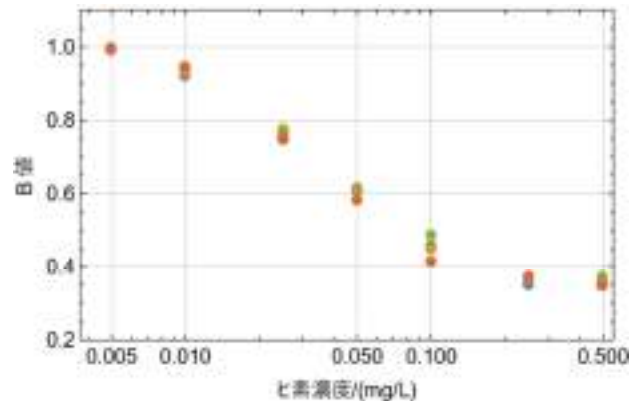


図 6. 濃度軸を対数とした検量線.

図5に示すように、ヒ素濃度が0.1 mg/Lを超える場合にはB値の変化は定量に利用するには不十分なほど小さくB値を定量に利用することは不適当と考えられる。一方、この濃度範囲ではR値の変化が大きく、G値の変化がそれに次いだ(図7)。図7に示すように、ヒ素濃度の対数値とR値との関係はヒ素濃度0.1 mg/Lと0.5 mg/Lの範囲ではほぼ直線的であった。したがって、この濃度領域のR値のデータに式(1)を当てはめることによりヒ素濃度の定量が可能と考えられる。

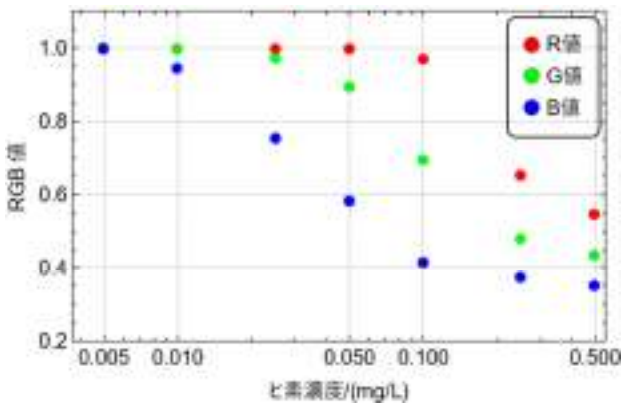


図7. ヒ素濃度とR, G, B値の関係.

以上述べたのは、ヒ素濃度あるいはその対数値とR値, G値, またはB値のいずれかとの関係を利用して検量線を作成する方法である。このやり方は単純ではあるが、ヒ素濃度0.5 mg/L以下の濃度領域での定量には少なくとも3つの検量線を用いる必要があった。

そこで、できるだけ広い濃度領域を1つの検量線で処理することを目的とし、R, G, Bのすべてを用いて検量線式を構築することを試みた。その結果ヒ素濃度の対数値は次の式

$$\log(\text{ヒ素濃度}) = a \times R \text{ 値} + b \times G \text{ 値} + c \times B \text{ 値} + d \quad (2)$$

という式でよく近似できることがわかった。ここでa, b, c, dは定数である。図6でプロットしたデータの1つに(2)式を当てはめたところ、 $a = -2.09491$, $b = 1.3886$, $c = -2.6794$, $d = 1.14074$ という値が得られた。この式を用いてR, G, Bの測定値からヒ素濃度の対数値を計算し、それを検量線作成に用いた標準溶液のヒ素濃度の対数値に対してプロットしたのが図8である。

両者はよく一致している。このことは、R, G, B値のすべてを利用し、式(2)の形の式を当てはめることにより、ヒ素濃度0.005 mg/Lから0.5 mg/Lの前濃

度範囲に適用できる検量線式を求めることができることを意味している。

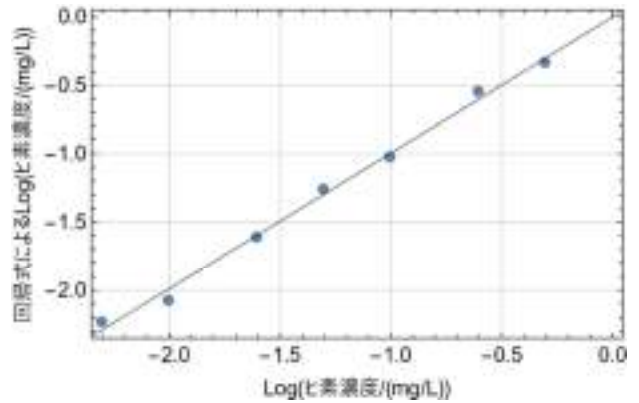


図8. (2)式を用いて計算したヒ素濃度の対数値と実際のヒ素濃度の対数値との関係.

結局、検量線はヒ素濃度に応じて次のような要領で作成することが適当と考えられる。

- 1) ヒ素濃度0 mg/L~0.025 mg/Lの範囲では、ヒ素濃度とB値の間の直線関係を利用する。
- 2) ヒ素濃度0.01 mg/L~0.1 mg/Lの間ではヒ素濃度の対数値とB値の間の直線関係を利用する。
- 3) ヒ素濃度0.1 mg/L~0.5 mg/Lでは、ヒ素濃度の対数値とR値との間の直線関係を利用する。
- 4) ヒ素濃度0 mg/L~0.5 mg/Lを対象とし、ヒ素濃度の対数値を重回帰式(2)で近似する。

3.3. ヒ素定量への適用

前述のヒ素定量法を、酸化水酸化鉄鉱物によるヒ素吸着実験の平衡溶液3種、および自然由来のヒ素汚染河川水、工場跡地のヒ素等を含む複合汚染地下水(SS含む)のヒ素濃度測定に応用した。同時に同じ溶液のヒ素濃度をICP-MS法によって測定して比較した(表2)。なお、定量のための検量線は前述1), 2), 3)を組み合わせで作成した。

表2. ヒ素含有水への適用結果。単位はmg/L.

試料	本法	ICP-MS
平衡溶液1	0.019	0.018
平衡溶液2	0.088	0.098
平衡溶液3	0.612	0.600
河川水	0.014	0.013
地下水(SS含む)	0.092	0.112

表2に示すように、SSを含まないヒ素溶液のICP-MS法による相対誤差は最大でも10%であったが、SSを含むヒ素汚染地下水のICP-MS法による相

対誤差は18%とやや大きい結果となった。公定法と本研究で提案する方法では、前処理（有機物分解など）の工程が異なる。そのためSSに含まれるヒ素の定量に関しては、分解の程度の差が測定結果に影響しているのではないかと考えられる。以上の結果より、この研究で提案する方法による定量法は、実験室における簡易定量法や水処理現場における工程管理のための定量法として活用できると考えられる。

4. 要約と結論

グートツァイト法に基づいた市販のヒ素試験紙をスキャナにより読取り、画像解析により得たR, G, B値とヒ素濃度との相関関係に基づいてヒ素を定量するという方法を検討し、次の結果を得た。

- 1) スキャナによる読取り結果は装置の立ち上げ直後から安定していた。
- 2) 試験紙の発色は、水で洗浄後、ろ紙による吸水後に暗所で温風乾燥しておけば1週間程度はほとんど変化しなかった。
- 3) ヒ素濃度0 mg/L～0.025 mg/Lの場合には、B値とヒ素濃度の間に直線関係があり、これを検量線として利用できる。
- 4) ヒ素濃度0.01mg/L～0.1 mg/Lの場合にはヒ素濃度の対数値とB値との間に直線関係があった。
- 5) ヒ素濃度0.1 mg/L～0.5 mg/Lの場合にはB値はほとんど変化しなかったが、ヒ素濃度の対数値とR値の間に直線関係があった。
- 6) ヒ素濃度0 mg/L～0.5 mg/Lの全範囲においては、ヒ素濃度の対数値とR値、G値、B値の線形回帰式も検量線として利用可能であった。
- 7) この方法をSSを含まないヒ素含有水のヒ素濃度測定に利用したところ、相対誤差は最大でも10%程度であり、水処理現場における工程管理などのために利用可能である。

引用文献

- 1) 桜井弘 (1998) 元素111の新知識. 講談社, 東京.
- 2) 柴田科学 (Feb. 20, 2023) ヒ素試験機グートツァイト法. <https://www.sibata.co.jp/item/3853/>.
- 3) MERCK (Feb. 20, 2023) エムクアントヒ素テスト. https://www.merckmillipore.com/JP/ja/product/Arsenic-Test.MDA_CHEM-117917.
- 4) Kalluri JR, Arbenshi T, Khan SA, Neely A, Candice P, Varisli B, Washington M, McAfee S, Robinson B, Banerjee S, Singh AK, Senapati D, Ray PC (2009) Use of gold nanoparticles in a simple colorimetric and ultrasensitive dynamic light scattering assay: Selective detection of arsenic ingroundwater. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 9668-9671.
- 5) Dominiiguez-Gonzales R, Verela LG, Bermejo-Barrera P.

- (2014) Functionalized gold nanoparticles for the detection of arsenic in water. *Talanta* 118, 262-269.
- 6) Boruah BS, Daimari NK, Biswas R (2019) Functionalized silver nanoparticles as an effective medium towards trace determination of arsenic (III) in aqueous solution. *Results in Physics* 12, 2061-2605.
- 7) Zheng B, Li J, Zheng Z, Huang C, Hong J, Li Y, Wang J.(2021) Rapid colorimetric detection of arsenic(III) by glutathione functionalized gold nanoparticles based on RGB extracting system. *Optics and Laser Technology* 133, 106522.
- 8) 農研機構 (Feb. 20, 2023) コメ中無機ヒ素の簡易分析法
https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/121228.html.

Technical report

Published by Astec Co., Ltd.

Technology Development Laboratory

〒671-2244 兵庫県姫路市実法寺 105

TEL : 079-267-5575 HP : <https://www.astec-geo.co.jp/index.html>

