

## アルギン酸カプセル（人工イクラ）を用いた鉄の簡易比色分析

菊地 洋一<sup>\*</sup>, 三上 広貴<sup>\*\*</sup>, 小山 あゆみ<sup>\*\*\*</sup>

(2016年3月3日受理)

Yoichi KIKUCHI, Hiroki MIKAMI, Ayumi OYAMA

Simple Colorimetric Analysis of Iron Using the Alginic Acid Capsule (artificial salmon roe)

### 1 緒言

水溶性の多糖類塩であるアルギン酸ナトリウムをカルシウムイオン溶液に加えると、アルギン酸イオンのイオン架橋反応が起こる。この反応を利用して、アルギン酸がゲル化したアルギン酸カプセルが生成される<sup>1), 2)</sup>。アルギン酸塩は海藻のぬめり成分で無害な物質であることや、アルギン酸カプセルがイクラに似ていることから、アルギン酸カプセルは人工イクラとして市場に出回っているものである。

この人工イクラの生成実験は、瞬時にゼリー状の球形カプセルができる様子が楽しいため、教育分野（各種イベント等の子ども科学実験など）でもよく取り上げられている。この際、人工イクラの内部に色々な色素を封入すれば、色とりどりの人工イクラを作ることできる。人工イクラの生成実験は子ども達に人気の科学実験の一つである。

人工イクラは、その内部に種々の試薬を取り込むことができるため、アイデア次第で人工イクラを活用した応用実験を考えることができる。すなわち、人工イクラの内部に特定の機能を有する試薬を封入すれば、種々の機能性人工イクラを生成することができる。例えば、山下らはサーモインク（温度により変色するインク）を封入した人工イクラを生成し、小学校理科の「水のあたたまり方」場面における実験教材に応用している<sup>3), 4)</sup>。

水質分析は環境教育の一環として教育現場でもよく取り上げられている。測定項目が明確な化学的分析法では、パックテストなどの簡易的な比色法が多く用いられている。ここで人工イクラの内部に目的分析成分の発色試薬を封入した機能性イクラを生成し、これを用いて水質分析を行うことができれば、学習者が楽しみながら水質分析に親しむことができると考えられる。そこで本研究では、分析対象として一般になじみ深い金属である鉄を選び、鉄イオン分析用の発色試薬を内部に封入した人工イクラを生成し、その人工イクラを用いて鉄イオンの分析を行うための方法を検討した。測定は、着色した人工イクラの色の濃さから鉄濃度を見積もる。色の濃さの見積もりは、目視法と、さらに精密な分析を行うためにデジタルカメラ（以下 デジカメと略記）を用いた測定法を検討した。

これらの検討結果から、楽しみながら水質分析を体験する教材として、比色分析機能を有する人工イクラを用いた鉄の簡易水質分析法の開発を行った。

### 2 鉄イオンの比色分析の概要

鉄の発色試薬には1,10-フェナントロリン (phen) を用いた。2価の鉄イオンを含む溶液に phen を加えると安定な錯体 ( $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ ) を形成し、溶

<sup>\*</sup> 岩手大学教育学部、<sup>\*\*</sup> 岩手県前沢中学校（平成26年教育学部卒）、<sup>\*\*\*</sup> 岩手県矢巾中学校（平成27年教育学部卒）

液は赤橙色を呈する。この反応系は鉄の比色分析の代表的な反応である<sup>5)</sup>。

本研究では、鉄濃度が予めわかっている一連の溶液（検量線溶液）と鉄濃度未知の天然水試料のそれぞれに phen を封入した人工イクラを加えることにより、人工イクラを着色させる。それぞれの溶液から人工イクラを取り出した後、人工イクラの色の濃さを比べること（比色）により鉄濃度を見積もることができる。これらの過程の詳細な実験条件の検討と結果について後述する。

簡易比色分析法において、デジカメは測定機器として大変有効に用いることができる<sup>6)~8)</sup>。そこで本研究においても色の濃さの見積もりは、目視法とデジカメを用いた測定法を用いた。

### 3 実験

#### 3-1 溶液の調製

保存溶液として、2 wt% のアルギン酸ナトリウム溶液（関東化学の鹿1級試薬を溶解）、1 wt% の塩化カルシウム溶液（和光純薬工業の特級試薬（ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）を溶解）、0.05 M の phen 溶液（関東化学の特級試薬（ $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）を溶解）、50 ppm の鉄溶液（関東化学の特級試薬（ $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ）を溶解し、硝酸で pH 2 に調整）をそれぞれ調製した。また、鉄の還元剤として 5 wt% の塩酸ヒドロキシルアミン溶液、緩衝液として 0.2 M の酢酸水溶液と 0.2 M の酢酸ナトリウム水溶液の等量混合液（pH 4.8）をそれぞれ調整した。これらの溶液を適宜希釈して実験を行った。

#### 3-2 実験操作

実験の流れを図1に示す。操作手順は次の通りである。(1) 25 mL 用のビュレットにアルギン酸ナトリウム（1 wt%）、phen（0.01 M）、酢酸緩衝液の混合溶液を入れた。塩化カルシウム溶液（50 mL）をビーカーに入れた。(2) ビュレット内の混合溶液を塩化カルシウム溶液に滴下した。これにより瞬時に phen 入りの人工イクラができる。(3) 薬さじを用いて人工イクラをビーカーから取り出

した。人工イクラの数が多い場合には、キムワイプ（キッチンペーパーなどで代用可）でろ過して人工イクラを取り出した。(4) 検量線用の鉄溶液あるいは天然水試料、塩酸ヒドロキシルアミン（0.5 wt%）、酢酸緩衝液の混合溶液（50 mL）に phen 入り人工イクラを入れ、マグネティックスターラーで攪拌した。

(4) において、水溶液内の  $\text{Fe}^{2+}$  が人工イクラ内に取り込まれ、Fe-phen 錯体を生成する。これにより人工イクラは赤橙色に呈色する。この後、人工イクラをマイクロプレートに入れ、目視およびデジカメでの測定を行った。

#### 3-3 デジカメによる測定

デジカメによる測定は次のように行った。① Fe-phen 錯体で着色した人工イクラをビーカーから取り出し、マイクロプレートのウェル（穴）に入れる。②これを光源となる蛍光板（フジカラー カラーイルミネーター）の上に置く。マイクロプレート中心部にカメラレンズが位置するように三脚でカメラを固定し、マイクロプレートの真上からデジカメで撮影する。このとき部屋は暗室とする。③撮影した画像をパーソナルコンピュータに取り込む。④画像処理ソフトを用い、画像上のイクラ中央部分の色情報を RGB の値として数値化する。RGB 値を数値化するソフトは多くのものがある。我々は画像上の選択範囲の RGB 値の平均値が簡単に表示できる Corel Paint Shop Pro X5 を用いている。

Fe-phen 錯体は赤橙色を呈することから、RGB のそれぞれの値の中で、人工イクラの色の濃さを最も鋭敏にモニターできるのは B 値である。よって本研究では B 値の変化を用いて実験を進めた。

デジカメには数万円の普及品である FUJIFILM FinePix S8000fd を用いた。フラッシュを OFF とし、プログラムモード、ISO 100、露出補正なしで撮影した。撮影画像は JPEG 形式で保存されたものを加工しないで解析した。

これらの実験操作における細かな条件検討を行った。条件決定後、検量線を作成し、天然水の分析を行った。

## 4 結果と考察

### 4-1 実験条件の決定

$\text{Fe}^{2+}$  と phen の錯生成のための試薬濃度や pH は、水溶液における一般的な条件を参考にして図1に示した条件を用いることとした。本法に適した人工イクラの生成条件を決めるため、図1 (1) における Ca 溶液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 0.1 wt% ~ 1.0 wt% まで変化させて実験を行い、それぞれの濃度条件で得られた人工イクラを 4 ppm の鉄溶液と反応させた後、デジカメで測定した。結果を図2に示す。図2の横軸は、図1 (4) の  $\text{Fe}^{2+}$  との反応時間を示している。縦軸は、デジカメで測定した B 値の値であり、人工イクラの色が濃いほど B 値は小さな値となる。

図2から  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に関わらず、 $\text{Fe}^{2+}$  との反応時間が 0 - 40 分までは反応時間が長いほど B 値が小

さくなることがわかった。人工イクラ中での Fe-phen 錯体の生成反応が徐々に進んでいると考えられる。また  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低い場合に比べ、0.5 % 以上の高い濃度の方が B 値が小さくなることがわかった。0.5 % ~ 1.0 % の条件の B 値には大きな差はない。これらのことから  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の最適条件は、0.5 % ~ 1.0 % の中間をとり 0.7 % に決定した。

次に図1の (2) でビュレットから混合溶液を滴下した後、(3) で生成した人工イクラを取り出すまでの時間を 1, 5, 10 分と変化させて、人工イクラの呈色の違いを調べた。すなわち人工イクラの生成時間についての検討である。ここで  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は 0.7 %、 $\text{Fe}^{2+}$  濃度は 4 ppm とした。結果を図3に示す。図3の横軸および縦軸は図2と同様である。図3より、全体的に  $\text{Fe}^{2+}$  との反応時間が長くなるにつれて、はじめは B 値が徐々に減少するが、ある時間を過ぎると B 値が徐々に増加していく傾向にあることがわかる。B 値の減少は Fe-phen 錯体の生成が進むためと解釈できるが、B 値の増加については現時点では理由が不明である。 $\text{Fe}^{2+}$  との

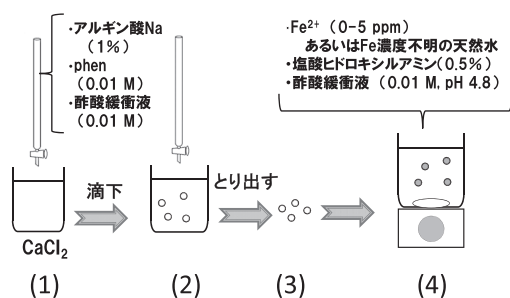


図1 実験操作の流れ

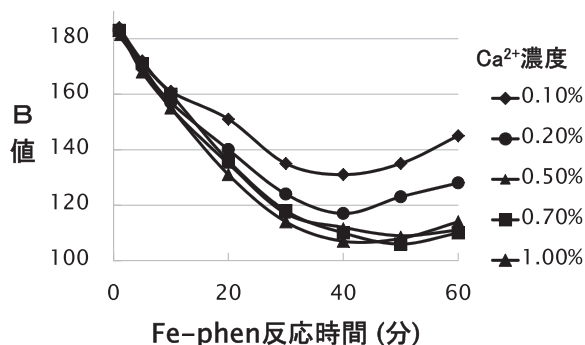


図2 カルシウムイオン濃度の検討

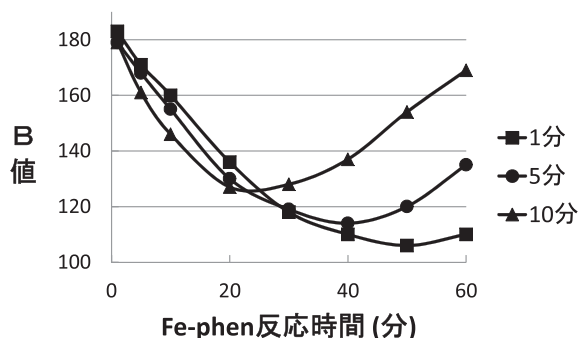


図3 人工イクラの生成時間の検討

反応時間が20分程度までは、人工イクラの生成時間の違いによるB値の挙動の差はそれほど大きくない。人工イクラの生成時間が10分の場合には、 $\text{Fe}^{2+}$ との反応時間が20–30分においてB値が極小となり、その後増加に転じている。同様に、人工イクラの生成時間が5分の場合には $\text{Fe}^{2+}$ との反応時間が40分においてB値が極小となる。人工イクラの生成時間が1分の場合には $\text{Fe}^{2+}$ との反応時間が50分においてB値が最も小さな値となっているが、40–60分の値に大きな差はない。また人工イクラの生成時間が1分と5分の場合のB値は、 $\text{Fe}^{2+}$ との反応時間40分まではほぼ同じである。

これらのことから図1の(2)で人工イクラを生成してから(3)で人工イクラを取り出すまでの時間は、1分後素早く操作し、5分までに終了することとした。

実験操作の最後で人工イクラを測定する際に、できるだけイクラの形状(形や大きさ)が揃ったものを比較したい。図1の(2)で生成する人工イクラは、ビュレットの滴下速度を一定にすれば、ほぼ同じ形状(球形で大きさも揃っている)のイクラが得られる。しかし念のために図1(4)では、1つの鉄溶液に人工イクラを6–10個入れ、 $\text{Fe}^{2+}$ と反応させる。反応後のイクラは4個以上を取り出して測定し、測定値の誤差も検証したい。したがって鉄溶液の種類が多くなると(2)で作成する人工イクラの数は多くなるが、ビュレットで滴下する方法では1分でも多数の人工イクラを作成できる。また多数の人工イクラを取り出すのは、キムワイプやキッチンペーパーなどでろ過するのが簡便である。これらの方法により5分以内に(3)までの操作を行うことが可能である。

図2および図3の結果から図1の(4)における $\text{Fe}^{2+}$ との反応時間は、40分が高感度で望ましい。しかし実際の教育場面を考えると40分の反応時間を確保するのは難しい場合もあると考えられる。その場合には、測定感度は低下するが $\text{Fe}^{2+}$ との反応時間を短縮して測定することも可能であることを後述(4–4)した。

#### 4–2 デジカメ測定と精度

図1(4)で呈色した人工イクラはマイクロプレートに入れて、デジカメ測定に供する。マイクロプレートの各ウェル(穴)に人工イクラを入れ、写真を撮ることによって多数の人工イクラの色情報を一度に測定することが可能である。したがって鉄濃度が異なる一連の検量線溶液と実試料溶液の人工イクラの分析も一枚の写真で行うことができ、大変簡便である。ただしこの場合、マイクロプレート上の各ウェル間の測定条件が同一であることが前提となる。

そこで同濃度の鉄溶液と反応させた人工イクラをマイクロプレート上の各ウェルに入れて測定を行い、測定値のバラツキについて調べた。この実験は上記の各ウェル間の測定値のバラツキも含めて、本法の全操作を通しての精度の確認になる。マイクロプレートには96ウェルのものを用いた。4–1で決定した条件で4 ppmの鉄溶液と40分間反応させた人工イクラを96ウェル(8行×12列)のすべてに1個ずつ入れ、デジカメで測定した。測定した画像を図4に示す。

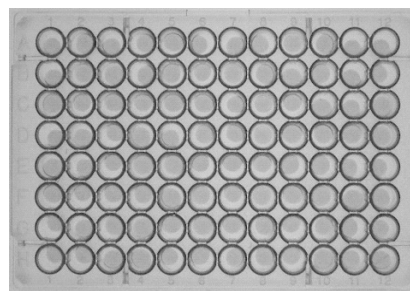


図4 マイクロプレート上の人工イクラ  
(精度確認実験)

96個の人工イクラの測定値(B値)は、 $125.6 \pm 4.6$  (平均値±標準偏差)であった。相対標準偏差は4.0%である。このことから本法は、図1(1)–(4)で人工イクラを呈色した後、デジカメ測定するまでの全ての操作を通して高精度な測定が可能になった。



### 4-3 検量線

これまでに決定した実験条件で鉄濃度0-5 ppmの測定を行い、検量線を作成した。測定したB値は鉄濃度の増加とともに単調に減少したため、B値で検量線を作成することも可能であるが、以下の簡単な計算をすると直線関係の検量線が得られると考えられる。

鉄濃度0のブランクにおけるB値を入射光の値 ( $I_0$ )、鉄濃度1-5 ppmにおけるB値を透過光の値 ( $I_t$ ) として式 (1) に代入すると吸光度 (A) を求めることができる。吸光度 (A) の値は Lambert-Beer の法則により鉄濃度と直線関係が期待される。

$$A = -\log(I_t/I_0) \quad \cdots \text{式 (1)}$$

測定したB値から吸光度 (A) に変換して作成した検量線を図5に示す。図5からわかるように、本法により鉄濃度0-5 ppmの範囲で直線性を示す良好な検量線が得られた。

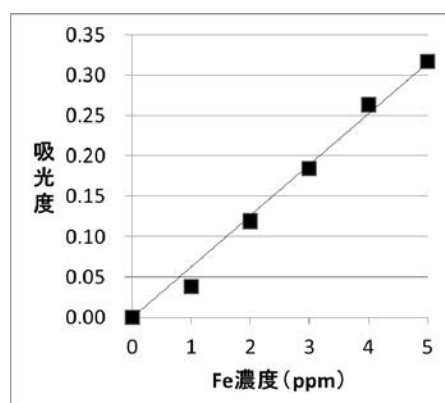


図5 鉄の検量線

### 4-4 実試料の分析

本法による河川水の分析を行った。実試料には岩手県内の赤川の水を用いた。赤川は旧松尾鉱山跡から地下水が流入し、鉄濃度が高い河川である。学生実験の1コマを利用して、実験手順を説明しながら岩手大学教育学部化学教室3年の5名の学生に分析実験を実施してもらった。図1 (4) の  $\text{Fe}^{2+}$  との反応時間は、4-1で述べたように40分が望ま

しいが、分析時間短縮の可能性を確かめるため15分の場合も測定した。またデジカメ測定の際に、目視法の測定も行った。目視法では呈色した人工イクラをマイクロプレートに入れた後、マイクロプレートを白紙上に置いて、検量線用の人工イクラと実試料用の人工イクラの色を目視で比較して値を読み取った。測定したマイクロプレートの一列を図6に示す。図6の3列目-6列目が検量線溶液で呈色した人工イクラである。この実験では上の1行目から、鉄濃度：0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ppmであり、1種類の濃度について4個の人工イクラをセットした。7列目-10列目、上から4行目が河川水の溶液で呈色した人工イクラで、左に位置する検量線用イクラと比較して比色分析した。河川水試料は試薬調整の際に希釈して測定しており、今回の実際の測定値は上流水、中流水ともに2 ppm程度である。

上記の人工イクラによる測定に加えて、基準となる分析値を得るために JIS 法に準拠した分析法に従って水溶液で反応を行い、分光光度計で測定する分析も行った。これらの分析結果を表1にまとめて示す。

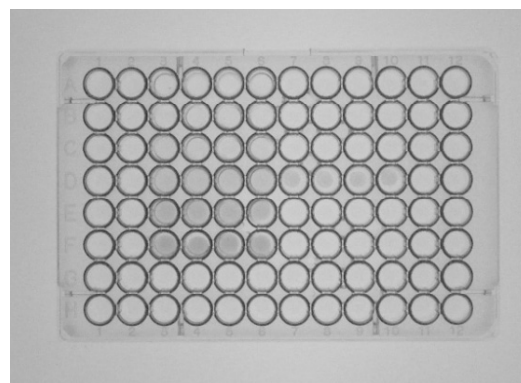


図6 マイクロプレート上の人工イクラ (河川水の測定)

表1 赤川水中のFe濃度の分析結果

	赤川上流水の Fe濃度 (ppm)	赤川中流水の Fe濃度 (ppm)
分光光度計	9.87	3.53
デジカメ測定(15分反応)	9.1 (9.0-9.2)	3.7 (3.1-4.4)
デジカメ測定(40分反応)	9.7 (8.7-10.7)	3.7 (3.5-3.9)
目視測定(15分反応)	9.6 (9.0-11.0)	3.4 (3.1-3.6)
目視測定(40分反応)	9.6 (9.0-10.0)	3.0 (2.8-3.6)

\*カッコ内は分析値の範囲を示す。

表1の結果から、微量な ppm レベルの鉄を対象とした簡易分析として、人工イクラを用いた分析値は、分光光度計での分析値と十分な一致を示している。また本実験は初めてこの実験を行った実験者による分析値であることから簡便法としての本法の有効性が確認された。

$\text{Fe}^{2+}$  との反応時間については、上流水のデジカメ測定15分の分析値が幾分低い値であるが、全体的に大きな違いはない。したがって15分の反応時間でも測定可能であることがわかった。

デジカメ測定と目視測定の比較においても大きな差はなかった。上述のように今回の実際の測定は2 ppm 前後で行い、希釈率を用いて分析値を得ている。マイクロプレートを目視した場合、1 ppm 以下では色が薄すぎて比色の判断が難しいが、それ以上では比色の判断がやりやすい。今回の結果から鉄濃度が低い試料でなければ目視法での測定も可能なことがわかった。

## 5 おわりに

本研究は、楽しみながら水質分析を体験する教材として、比色分析機能を有する人工イクラを用いた鉄の簡易水質分析法の開発を行った。本法により、鉄濃度0-5 ppm の範囲で直線性を示す良好な検量線が得られた。本法を河川水の分析に適応した結果、本法の分析値は分光光度法での分析値とよい一致を示し、本法の有効性が示された。

本法では高価な分析機器を用いなくともデジタルカメラを検出器に用いることで高精度な測定を行うことができる。さらに簡便な方法として目視法による分析も可能である。その際には検量線用の人工イクラについては、あらかじめ呈色したものの写真を撮影しておき、それを用いて天然水の分析を行うことも考えられる。小学校から大学まで教育目的や実施時間に合わせて本法を活用し、人工イクラの生成、比色分析や水環境への興味関心を高める教材となることが期待される。

## 参考文献

- 1) 宮島千尋, 「アルギン酸類の概要と応用」, 繊維と工業, Vol.65, No.12, 444-448 (2009)
- 2) 塩谷敏明, 「アルギン酸カルシウムゲルから成るカプセル体および粒子の性質」, 紛体と工業, Vol.21, No.7, 43-49 (1989)
- 3) 山下修一, 「小学校4年「水や空気のあたたまり方」をどのように表現するか」, 日本理科教育学会第63回全国大会論文集, 244 (2013)
- 4) 山下修一, 秋保佳弘, 「小学校4年「水のあたたまり方」にサーモインクを取り入れた効果」, 日本理科教育学会第64回全国大会論文集, 210 (2014)
- 5) 並木博編集, 「詳細工業排水試験方法(改訂2版)」, 366 (1995), 日本規格協会
- 6) 菊地洋一, 柿崎仁美, 井上祥史, 武井隆明, 村上祐, 「デジタルカメラと画像処理ソフトを用いた天然水中の微量鉄の定量」, 化学と教育, Vol. 50, 714 (2002)
- 7) 菊地洋一, 「デジタルカメラを検出器に用いた微量鉄の高感度分析法の開発」, 理科教育学研究, Vol. 52, 191 (2012)
- 8) 菊地洋一, 田沼雄太朗, 井上祥史, 「デジタルカメラを用いる河川水中の陰イオン界面活性剤の簡易イオン対抽出比色分析」, 分析化学, Vol. 60, 743 (2011)