

デジタルカメラとウェルプレートを用いた連続変化法の スモールスケール実験

菊地 洋一*, 平澤 傑**, 井上 祥史*, 武井 隆明*, 村上 祐*

(2013年3月5日受理)

Yoichi KIKUCHI, Suguru HIRASAWA, Shoshi INOUE, Taka-aki Takei, Tasuku MURAKAMI

Small-Scale Experiments of the Continuous Variation Method by the Use of the Digital Camera and Wellplate

1 緒言

ウェルプレート等を用いて実験のスケールを小さくするスモールスケール実験法は、環境にやさしい化学実験法として注目を集めている。これまでに義務教育段階の実験から大学での基礎化学実験までの広い範囲にわたるスモールスケール実験が多数提案されている¹⁾²⁾。実験のスモールスケール化には、省資源、実験廃棄物の少量化、コストの削減および危険性の軽減のほか、通常はグループで行う実験を個人実験化できるなど多くのメリットがある。その一方で、比色定量実験のスモールスケール化などにおいては、精度や正確さの上で改良の余地があると思われる。

著者らは、デジタルカメラを分光検出器として用い、教育現場においても正確な比色定量実験が行える測定法の開発を行っている。これまでに天然水中の微量鉄や陰イオン界面活性剤の分析法に適用し良好な結果を得ている³⁾⁻⁵⁾。デジタルカメラによる測定（以下 デジカメ測定）をスモールスケールの比色実験に応用すれば、スモールスケール実験の正確な定量化が期待できる。そこで本研究では、大学の基礎化学実験として取り上げられることも多い連続変化法による金属錯体の組成決定実験をスモールスケール化するために、デジカメ測定とウェルプレートを用いることを検討し

た。対象とした錯体は、鉄(II)と *o*-フェナントロリン (phen) の錯体 (Fe-phen 錯体) および銅(II) と4-(2-ピリジルアゾ)レゾルシン (TAR) の錯体 (Cu-TAR 錯体) である。

2 実験

2-1 鉄(II) - phen 錯体系

<保存溶液>

1.5×10^{-3} M の鉄溶液 (関東化学の特級試薬 (FeSO₄ · 7H₂O) を溶解), 1.5×10^{-3} M の phen 溶液 (和光純薬の特級試薬を溶解) をそれぞれ調製した。また、鉄の還元剤として4%の塩酸ヒドロキシルアミン溶液、緩衝液として0.1 Mの酢酸水溶液と0.1 Mの酢酸ナトリウム水溶液の等量混合液 (pH 4.8) をそれぞれ調製した。

<通常スケールの実験>

11本のメスフラスコ (50 mL) に、鉄溶液と phen 溶液をそれぞれ1 mLずつ液量を変化させながら、鉄溶液と phen 溶液の合計量が10 mLとなるように加えた。(鉄溶液+phen 溶液) がそれぞれ (0 mL+10 mL), (1 mL+9 mL), (2 mL+8 mL), … (10 mL+0 mL) である。さらにすべてのメスフラスコに塩酸ヒドロキシルアミン溶液を5 mL, 酢酸緩衝液を5 mL加えた。メスアップ後、30分以上放置したものを測定溶液とした。

*岩手大学教育学部、**岩手県一関中学校 (平成21年教育学部卒)

デジカメ測定では、これらの溶液をウェルプレート内の各ウェルに2 mLずつ分取し測定を行った。同様にこれらの溶液を吸収セルに分取し、分光光度計による測定も行った。

<スモールスケール実験>

溶液の液量を少なくするスモールスケール実験では、測定溶液の調製を直接ウェルプレート内で行った。11個のウェルにマイクロピペットを用いて（鉄溶液+phen溶液）がそれぞれ（0 mL+1.0 mL）、（0.1 mL+0.9 mL）、…（1.0 mL+0 mL）のように混合比を0.1 mLずつ変化させ、合計量が1.0 mLとなるように加えた。さらにすべてのウェルに塩酸ヒドロキシルアミン溶液を0.5 mL、酢酸緩衝液を0.5 mL加え、ウェル内の全液量を2.0 mLとした。これをデジカメ測定に用いた。

2-2 銅(II)-TAR錯体系

<保存溶液>

1.0×10^{-3} Mの銅溶液（関東化学の特級試薬（ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ）を50%エタノール水溶液に溶解）、 1.0×10^{-3} MのTAR溶液（同仁化学のドータイトTARを50%エタノール水溶液に溶解）をそれぞれ調製した。また、緩衝液として0.1 Mの酢酸溶液と0.1 Mの酢酸ナトリウム溶液の等量混合液を調製した。

<通常スケールの実験>

Fe-phen系と同様に、11本のメスフラスコ（50 mL）に銅溶液（0~10 mL）とTAR溶液（10~0 mL）をそれぞれ1 mLずつ液量を変化させながら、銅溶液とTAR溶液の合計量が10 mLとなるように加えた。さらにすべてのメスフラスコに酢酸緩衝液を5 mL加えた。メスアップ後、30分以上放置したものを測定溶液とし、分光光度計で測定した。

<スモールスケール実験>

Fe-phen系と同様に、11個のウェルに（銅溶液+TAR溶液）がそれぞれ（0 mL+1.0 mL）、（0.1 mL+0.9 mL）、…（1.0 mL+0 mL）のように混合比を0.1 mLずつ変化させ、合計量が1.0 mLとなるように加えた。さらにすべてのウェルに酢酸緩衝

液を1.0 mL加え、ウェル内の全液量を2.0 mLとした。これをデジカメ測定に用いた。

2-3 デジカメによる測定方法

デジカメによる測定方法のイメージ図を図1に示す。実験テーブルの上に白色ケント紙を敷き、その上8 cmぐらいの間隔をあけてガラス板を置いた。ガラス板の上にウェルプレートの長辺が部屋の窓と平行になるようにウェルプレートを置いた。ウェルプレート（12 cm × 8 cmのプラスチック製）は24ウェルのものを用いた。ガラス板とケント紙の間隔は、着色溶液を入れたウェルプレートを真上から覗いた時に溶液が透明に見える（影がなく見える）距離である。実験者が外からの光を遮らないように窓に向かって立ち、ウェルプレートの真上からデジカメで撮影した。デジカメにはNikon COOLPIX S510を用い、ストロボオフのオートモードで撮影した。

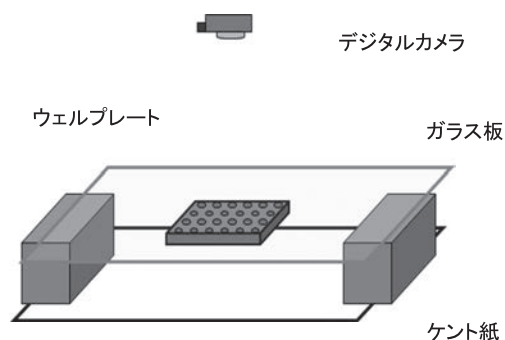


図1 デジカメ測定の配置

撮影したデジタル写真をパーソナルコンピュータに取り込み、画像処理ソフトを用いて写真内の溶液部分の色情報をRGB値として数値化した。本研究では画像処理ソフトには、任意の選択範囲の色情報を平均値で表示できるPaint Shop Pro 8（Jasc Software Inc.）を用いた。

3 結果および考察

3-1 デジカメの撮影（測定）条件

図1の配置でデジカメ測定を行うに当たり、1枚のウェルプレートの各ウェルで差がなく測定できる撮影条件を検討した。試料にFe-phen錯体溶

液を用い、中央の2ウェルを除いた全てのウェルに同一試料を同量入れて撮影した。中央の2ウェルには鉄を含まないブランク溶液を入れた。

部屋の蛍光灯を点けていると蛍光灯が一部のウェルに映るため消灯し、光源は外からの自然光とした。また窓枠等がウェルに映らないように窓から2 m程度離れた距離で撮影することにした。ウェルプレートとカメラの距離は、約20cmでウェルプレートがほぼ画像いっぱいになる。しかしこの場合には端のウェルでは溶液を斜めに覗いているので中央のウェルに対して溶液の光路長が長くなる。この問題はウェルプレートとカメラの距離を広げることによってかなり軽減される。ウェルプレートの画像があまり小さくならず、また撮影もしやすい距離を検討したところ、約40cmが適切であった。以上の条件で撮影（測定）した写真を図2に示す。写真の上方が窓側である。ウェルの上から3行目の中央2つのウェルはブランク溶液で無色である。



図2 ウェルプレートのデジカメ写真

デジタル画像上の各ウェル内の溶液部分について、画像処理ソフトを用いてRGB値を求めた。その結果、最下行の6個のウェルのRGB値が、他のウェルに比べてやや低い値となるが、その他のウェルの錯体溶液のRGB値は数%の誤差でほぼ一定の値を示すことが確認できた。よって以後の実験ではこれらのウェルを利用することとした。これらのウェルには通常の一つの実験に対応する一連の溶液を収めることができる。よって一枚の写真の中の比較値で実験の結果を求めることができたため、写真毎の撮影条件の違いを考える必

要はない。またこのことは一つの実験に必要な多数の測定溶液を瞬時に測定できることを意味しており、スモールスケールに加えて、測定法として大変有利な点である。

3-2 鉄(II) - phen 錯体の組成決定

図3に、2-1で調製したFe-phen錯体系溶液の吸収スペクトルを示す。

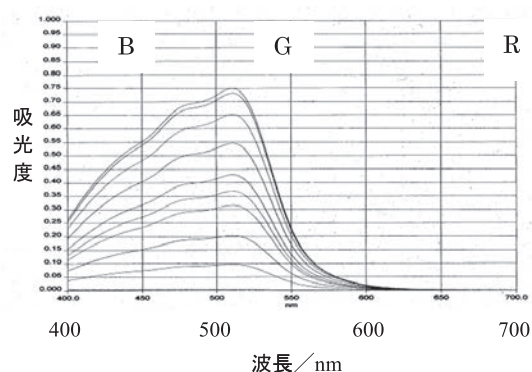


図3 Fe-phen 錯体の吸収スペクトル

Fe-phen 錯体のように錯体のみが吸収化学種の場合には、金属イオンと配位子の結合比に応じて、過不足なく反応する濃度条件で吸光度が最大値になる。Fe-phen 錯体はFe : phen=1 : 3で結合するため、吸光度 vs. (Fe濃度 / (Fe濃度 + phen濃度)) のプロットは横軸の値が0.25で最大の吸光度が得られるはずである。分光光度計測定の吸収極大波長(512 nm)におけるプロットでは横軸が0.23で吸光度が最大となり、理論値0.25にほぼ一致する値が得られた。

吸収スペクトルを測定した溶液と同じ溶液を、一枚のウェルプレートのウェルにそれぞれ2 mL取り、デジカメ測定を行った。デジタル画像のそれぞれのウェルからRGBの値を読み取った。RGBの値を鉄とphenの混合比(Fe濃度 / (Fe濃度 + phen濃度))に対してプロットしたものを図4(I)に示す。鉄 : phenの混合比に関わらずR値に大きな変化はなく、G値とB値は混合比が1 : 3に近いほど小さな値となった。国際照明委員会ではRGBに対応する光の波長をそれぞれR ; 700 nm, G ; 546.1 nm, B ; 435.8 nmと定義して

いる⁶⁾。図3からFe-phen錯体は、700 nm付近の光(R)を吸収しない。したがって混合比を変えてもR値は変化しない。また図3から546 nm付近(G)の吸収よりも436 nm付近(B)の吸収が強いので、錯体が形成されるにしたがってB値の方が大きく低下したと考えられる。Fe-phen錯体系ではG値とB値が解析に使える色情報である。前報に従いG値とB値を吸光度(Abs(G)およびAbs(B))に変換した³⁾⁴⁾。すなわち、式(1)で定義される吸光度において、入射光の強さ(I_0)には無色のブランク溶液(鉄のみの溶液とphenのみの溶液)のG値(あるいはB値)の平均値を代入した。透過光の強さ(I_t)には錯体溶液のG値(あるいはB値)の値をそれぞれ代入した。

$$\text{Abs} = -\log(I_t/I_0) \dots \dots (1)$$

得られた吸光度(Abs(G), Abs(B))から、吸光度 vs. (Fe濃度 / (Fe濃度 + phen濃度)) の関係をプロットした(図4(II))。直線の交点から吸光度が最大となる横軸の値を求めると、Abs(G), Abs(B)ともに0.23であった。この値は分光光度計で測定した値と一致している。よって本法でのデジカメによる測定は正確であることが確認できた。

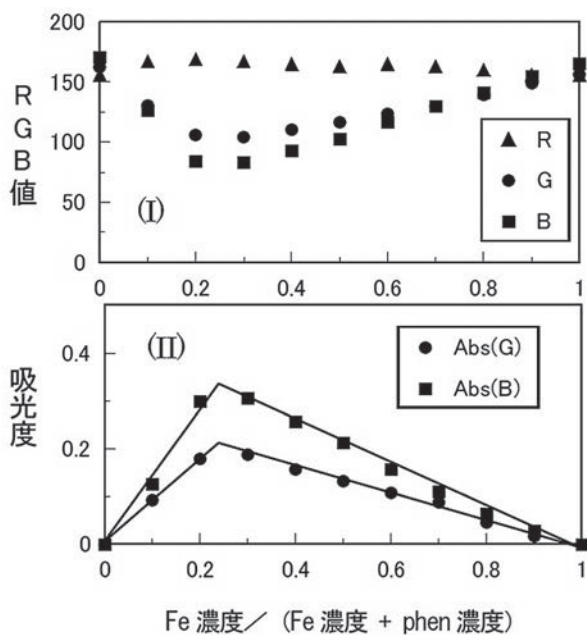


図4 Fe-phen錯体の連続変化法プロット (メスフラスコでの溶液調製+デジカメ測定)

次に同様の解析を試料をウェルプレート内で調製したスモールスケール実験の結果について行った。結果を図5に示す。図5の直線の交点から得られた横軸の値は、Abs(G), Abs(B)ともに0.24であり、理論値とよく一致した。よって本法によりFe-phen錯体の連続変化法を、一枚のウェルプレート上で、数mLの溶液量により正確に行うことができた。

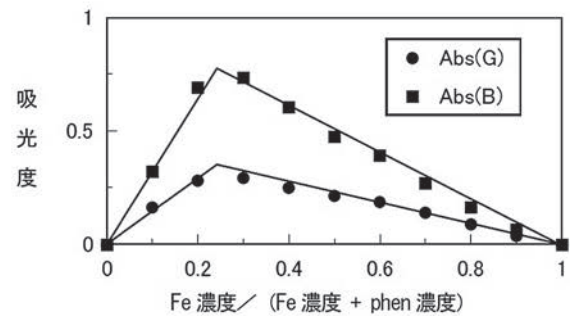


図5 スモールスケール実験によるFe-phen錯体の連続変化法プロット (ウェルプレートでの溶液調製+デジカメ測定)

3-3 銅(II)-TAR錯体系の組成決定

Fe-phen錯体系は錯体だけが可視光領域に吸収を示し、溶液は赤橙色を呈する。したがって錯体の生成比が高くなるにつれて、溶液の色は赤橙色が濃くなるだけの単色系の変化であった。これに対しCu-TAR錯体系(pH 5前後)では、錯形成していないTARの溶液は黄色を呈し、銅錯体溶液は赤紫色を呈する。したがってこの系の連続変化法では、黄色から赤紫色への変色を扱うことになる。この場合でもデジカメ測定で対応できるか、検討を行った。

図6に、2-2で調製したCu-TAR系溶液の吸収スペクトルを示す。511 nmを中心とする吸収が錯体の吸収であり、440 nm付近に極大を持つ吸収がフリーのTARの吸収である。溶液の色は銅濃度が相対的に高くなるに従い、TAR > Cuの範囲では黄→橙→赤→赤紫と変化し、TAR < Cuの範囲では赤紫色が徐々に薄くなる。最後のTARを含まない銅溶液は無色となった。スモー

ルスケール実験で錯体組成を確かめるため、ウェルプレート内で調製した溶液をデジカメ測定し、RGB値を抽出した。この系でも錯形成に従って変化するG値とB値を解析に用いた。ブランクをTARを含まない銅溶液として、G、B値からそれぞれの吸光度 (Abs(G), Abs(B)) を求めた。

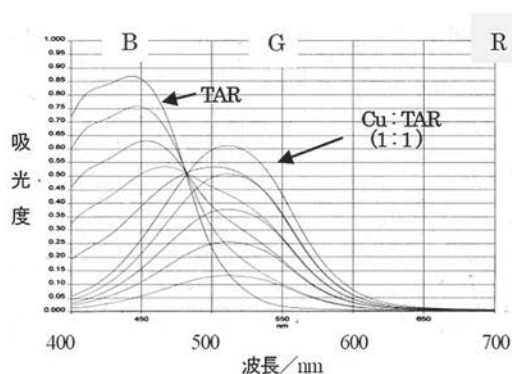


図6 Cu-TAR 錯体の吸収スペクトル

ここで得た吸光度 vs. (Cu 濃度 / (Cu 濃度 + TAR 濃度)) のプロットを図7に示す。Abs(G) 値は横軸の濃度比が0.5で頂点となる左右対称の山形のプロットが得られ、明確にCu:TAR=1:1の組成を示している。図6からわかるようにG値に対応する546.1 nmではフリーのTARの吸収はほとんどなく、ここでの吸収化学種はCu-TAR 錯体だけである。このように視覚的な観察で色調が変化していても、G値での解析では錯体の生成量だけに依存する単純な系となっている。

一方、図7のAbs(B)値は銅濃度が増加するにつれて、横軸の値が0~0.5 (TAR ≥ Cu) の範囲では直線的に急激に減少し、0.5~1.0 (TAR ≤ Cu) では直線的に緩やかに減少している。横軸0のAbs(B)値が直線から外れるのは、この点のB値が小さすぎて誤差が大きいためである。B値に対応する435.8 nmでは、TARの極大付近の強い吸収と錯体の弱い端吸収の加成性を考える必要がある。TAR ≥ Cuの範囲では、銅濃度の増加に伴い錯体量が増えフリーのTAR量が減少する。錯体生成による吸光度は微増だが、フリーのTAR量に伴う吸光度の減少は大きいので、全体的には吸光度が急激に減少したと解釈できる。TAR ≤ Cu

の範囲では加えたTARはすべて錯生成に使われるため、吸光度の変化は弱い吸収を示す錯体の存在量に依存する。横軸の値が大きいくほど加えるTAR量が少ないので生成する錯体量が減少する。よって吸光度は緩やかに減少すると解釈できる。このように配位子が吸収を示す場合でも、そのRGB値が錯体と異なるため、金属イオンと配位子が過不足なく反応した点を境に、傾きの異なる2本の直線となったと考えられる。Cu-TAR 錯体系では横軸の値が0.5で折れ曲がることからCu:TAR=1:1の組成を示している。

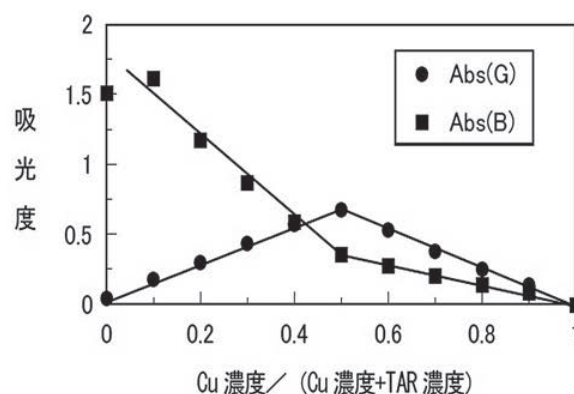


図7 スモールスケール実験によるCu-TAR 錯体の連続変化法プロット (ウェルプレートでの溶液調製 + デジカメ測定)

以上のことから配位子と錯体の双方が可視光領域に吸収を示すCu-TAR 錯体系の連続変化法においても、ウェルプレートとデジカメ測定の組み合わせによるスモールスケール実験によって、金属錯体の組成を正確に求めることができた。

4 結論

本研究ではスモールスケールの比色による定量的な実験にデジカメ測定を応用する一例として、金属錯体の連続変化法を取り上げ良好な結果を得た。本研究で取り上げた錯体の他にも多くの錯体の組成決定に適用できると考えられる。本測定法は、ウェルプレートとデジカメさえあれば、開放的な空間で写真を撮るだけであり、非常に簡便な方法である。大学での基礎化学実験で活用できるほかに、分光光度計を持たない高校でも発展的な

実験として実施できる。

さらに本測定法は、簡易比色分析や反応速度解析など種々の比色による定量的な実験をスモールスケール化した場合にも、正確な実験値を得るための方法として応用が期待できる。

参考文献

- 1) 「マイクロスケール化学実験」, 化学と教育 (日本化学会創立125周年記念号) (2003)
- 2) 芝原寛泰, 佐藤美子, 「マイクロスケール実験 -環境にやさしい理科実験-」, オーム社, (2011)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 菊地洋一, 田沼雄太郎, 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)
- 6) 三宅洋一, 「デジタルカラー画像の解析・評価」, 東京大学出版, 53 (2000)