

## SPADNS 比色分析法による水中のフッ化物の定量

Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計を用いた便利で正確な濃度測定



### 著者

Rogelio García and  
Geethika Weragoda  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計を使用し、SPADNS 比色分析法に従って、水中のフッ化物を定量しました。Agilent Cary WinUV ソフトウェアの Concentration モジュールを使用して、単一波長吸光度測定とデータ解析を実施しましたが、これにより時間のかかるデータ解析手順が削減されました。検量線は、0 ~ 1.4 mg/L の分析範囲で直線性を示しており、水サンプルの分析に使用できます。

## はじめに

フッ化物イオンは、水中に自然に存在します。表流水と地下水にはともに、フッ化物化合物を含む岩や土壌の風化に由来する、自然発生的なフッ化物が含まれています。2011年、世界保健機構（WHO）は、フッ化物の安全レベルは 0.5～1.5 mg/mL であると発表しましたが、これは気候や環境、その他のフッ化物供給元によって決まります。<sup>1</sup>通常、フッ化物は、世界中の多数の場所にある公共飲料水源に添加されています。このように飲料水中のフッ化物含有量は管理され調整されています。これはフッ化物添加と呼ばれており、フッ化物を地域社会に供給するためのコスト効率に優れた方法であると考えられています。一部の地下水や湧水には、高レベルのフッ化物が天然に含まれている場合があります。過剰量のフッ化物に長期間さらされると、フッ素症、がん、脳の発達障害など、健康面にさまざまな悪影響を与える可能性もあります。<sup>2</sup>このため、飲料水中のフッ化物含有量を正確に測定することは、重要な公衆衛生対策として非常に注目されています。

水中のフッ化物を定量するためのさまざまな手法が、環境保護庁（EPA）の参照メソッドである標準メソッド 4500-F で規定されています。この中でも、SPADNS 比色分析法（メソッド D）は、最も広く受け入れられているメソッドであると考えられており、0～1.4 mg/L の分析範囲での直線性を規定しています。ただし、非線形キャリブレーションを使用した場合には、分析範囲を最大 3.5 mg/L まで拡大できます。酸性条件下では、ジルコニウム-SPADNS 色素はフッ化物イオンにより解離され、無色の錯アニオン ( $ZrF_6^{-2}$ ) と黄色の SPADNS を生成し、その結果として色素の赤色に変色（漂白）します。この変色反応は、UV-Vis 分光光度計で

570 nm においてモニタリングできます。変色はフッ化物イオンの 1 つの機能であり、フッ化物の濃度に正比例しているため、水中のフッ化物を定量するために使用されます。対応する定量メソッドは、フッ化物濃度が異なる一連の標準フッ化物サンプルにおいて、570 nm で測定した吸光度に対してプロットした標準検量線を用いて作成されています。

このアプリケーションノートでは、Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計および Agilent Cary WinUV ソフトウェアの Concentration モジュールを使用して、SPADNS 比色分析法を基準にした、水中のフッ化物を定量するためのメソッドを作成しました。未知サンプルを分析する際には、ソフトウェアが自動的に検量線を使用してサンプル濃度を計算し、レポートを作成しますが、これにより時間のかかるデータ解析手順が削減されます。Cary WinUV ソフトウェアを分析要件に合うように調整して、UV-Vis 測定を簡略化することにより、分析を短時間で実施することができます。Cary WinUV ソフトウェアには、データを取得、分析、保管、表示すると同時に、そのデータを効率的に管理するための強力な機能と合理化されたメソッドが備えられています。さらに、定性的な波長スキャンまたは読み取り、濃度分析、酵素カインेटクス測定などの幅広いアプリケーションに対応するように設計されたさまざまなモジュールも含まれています。



図 1. Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計

## 実験

### 装置構成

この実験では、Cary 60 UV-Vis 分光光度計と光路長が 10 mm の石英製セルを使用しました。データは、Cary WinUV ソフトウェア、バージョン 5.1.3.1042 の Concentration モジュールを用いて取り込みました。各サンプルに対して、表 1 に示されているパラメータを用いて、570 nm での単一波長吸光度測定を 3 回の繰り返し分析で実施し、対応する検量線をソフトウェアで自動的に作成しました。検量線のフィッティングタイプと最小  $R^2$  (フィッティングの品質を示す指標) は、オペレータが設定できます。

表 1. 実験パラメータ

パラメータ	設定値
波長 (nm)	570
シグナル平均化時間 (s)	0.1
繰り返し回数	3
フィッティングタイプ	直線
$R^2$ 最小値	0.95000

### 材料とサンプル前処理

- **ジルコニル酸試薬**：133.0 mg の  $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$  を、25 mL の蒸留水に溶解しました。350 mL の濃塩酸を添加し、蒸留水で 500 mL に希釈しました。
- **SPADNS 溶液**：958.0 mg の SPADNS を蒸留水に溶解し、蒸留水で 500 mL に希釈して、赤色の溶液を調製しました。この溶液を、日光から保護するために茶色のボトルに保管しました。
- **酸-ジルコニル-SPADNS 試薬**：等量の SPADNS 溶液とジルコニル酸試薬を混合し、赤色の溶液を調製しました。
- **リファレンス溶液**：10 mL の SPADNS 溶液を、蒸留水で 100 mL に希釈しました。7 mL の濃塩酸を、蒸留水で 10 mL に希釈しました。次に、10 mL の酸溶液を、前に希釈した SPADNS 溶液に添加しました。生成した溶液を混合し、これを用いて分光光度計の基準点 (ゼロ) を調整しました。
- **検量線用のフッ化物標準溶液**：フッ化物イオンはガラスを化学的に侵すため、フッ化物標準溶液はすべてポリエチレン製フラスコで調製し、ポリエチレン製ボトルに保管しました。

- **フッ化物原液**：221.0 mg の無水フッ化ナトリウムを蒸留水に溶解し、蒸留水で 1,000 mL に希釈しました (100 mg/L)。
- **フッ化物標準溶液**：100 mL のフッ化物原液を、蒸留水で 1,000 mL に希釈しました (10 mg/L)。
- **フッ化物標準溶液**：適切な量のフッ化物標準溶液を蒸留水で 50 mL に希釈し、濃度 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/L の一連のフッ化物標準溶液を調製しました。10 mL の混合済み酸-ジルコニル-SPADNS 溶液を各標準溶液に添加し、十分に混合して着色溶液を調製し、光度測定を実施しました。

### フッ化物定量メソッドの作成

Cary WinUV ソフトウェアの Concentration モジュールを使用して、フッ化物定量メソッドを作成しました。メソッド設定は、(1) 標準サンプルを測定するためのメソッドを作成、(2) 標準溶液を測定してサンプル分析用の定量メソッドを作成、という 2 つのステップで構成されています。

#### 1. 標準サンプルを測定するためのメソッドを作成

メソッドは、Cary WinUV の Concentration モジュールで迅速かつ簡単に作成することができ、必要になるのは次に示すわずか数ステップのみです (図 2 参照)。

- A. Concentration モジュールを開き、**Setup** (設定) タブをクリックして機器設定ウィンドウを開きます。
- B. Cary タブの Wavelength (波長) オプションに、単一波長測定で使用する波長を入力します (この例では、「570」nm と入力)。
- C. **Replicates** (繰り返し分析回数) または **Sample/Std Averaging** (サンプル/標準平均化回数) を使用して、各標準で必要な繰り返し分析回数を入力します。この例では、各標準溶液のデータを、3 回の繰り返し分析で取得しました。
- D. Standards (標準) セクションで、標準サンプルの濃度を昇順に入力し、**Fit type** (フィッティングタイプ) を選択します。この例では、0 ~ 1.4 mg/L の濃度範囲において、Fit type (フィッティングタイプ) を Linear (直線) として選択しました。

**注**：SPADNS 比色分析法では、0 ~ 1.4 mg/L の分析範囲での直線性を規定しています。ただし、非線形キャリブレーションを使用すると、濃度範囲を最大 3.5 mg/L まで拡大できます。濃度範囲を拡大した場合は、フィッティングタイプを Quadratic (二次) として選択します。

- これで、ソフトウェアと機器の準備が完了しました。**Start** (開始) ボタンをクリックして、標準溶液の測定を開始します。

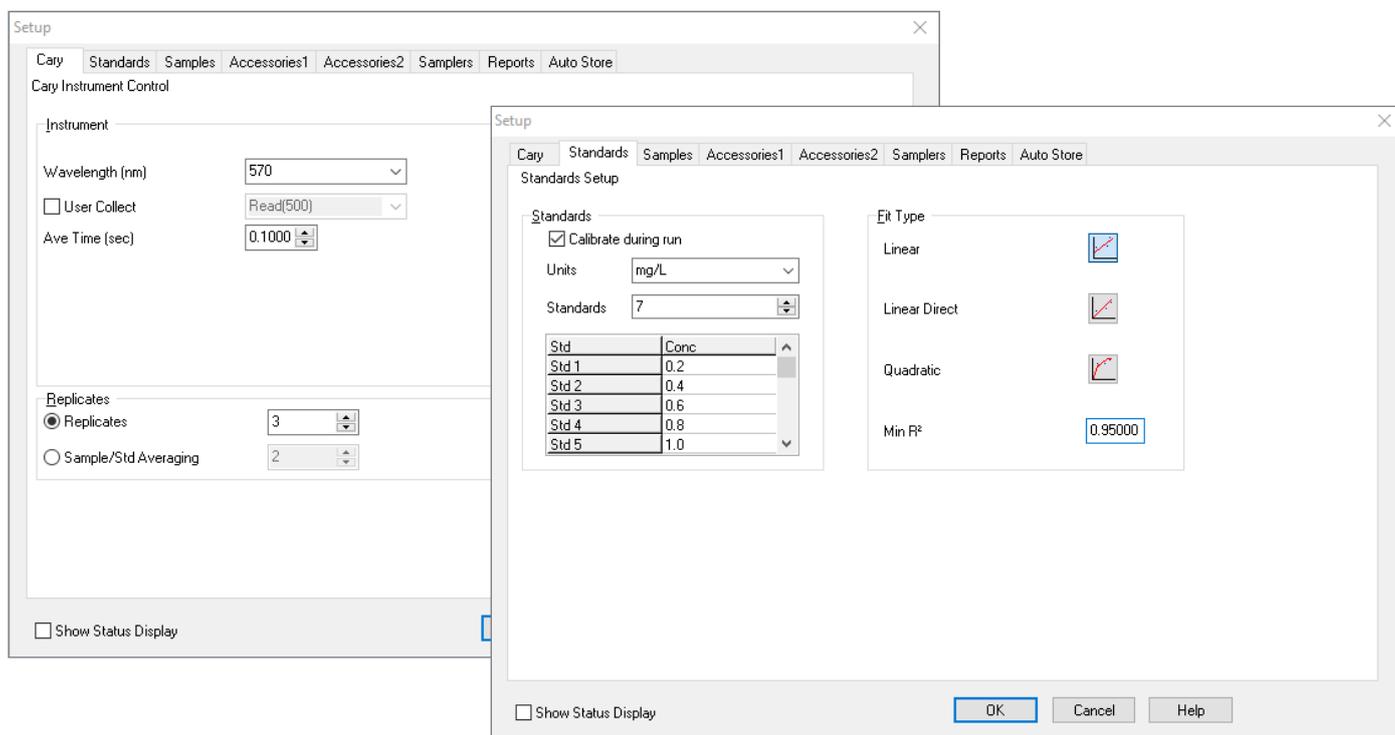


図 2. Agilent Cary WinUV ソフトウェアの Concentration モジュールを使用する際のデータ取り込みと分析の機器設定

## 2. 標準溶液を測定して定量メソッドを作成

**Start** (開始) ボタンをクリックし、ソフトウェアの指示に従って分析を開始します。最初に、リファレンス溶液を使用して、Cary UV-Vis 分光光度計の吸光度のゼロを設定しました。次に、Cary WinUV ソフトウェアのサンプルロード指示に従い、570 nm で標準サンプルの単一波長吸光度測定を実施しました。データ取り込み後に、対応する検量線と濃度分析レポートが、ソフトウェアにより自動的に作成されました (図 3A)。0 ~ 1.4 mg/mL の濃度範囲に対して、負の傾き 0.1872 の直線検量線と相関係数 ( $R^2$ ) 0.9993 が得られました。濃度分析レポートは、サンプル濃度、平均吸光度、キャリブレーション計算式、相関係数といったキャリブレーションデータで構成されています。さらに、データ解析を簡単にするため

に、各サンプルの吸光度測定値の標準偏差 (SD) とパーセント相対標準偏差 (%RSD) がレポート内に表示されています (図 3B)。結果レポートは、指定したフォントサイズ、色、フォントタイプにより、簡単にカスタマイズできます。フッ化物定量メソッドは、サンプルの分析に再利用できるように、ソフトウェア内に保存しました。

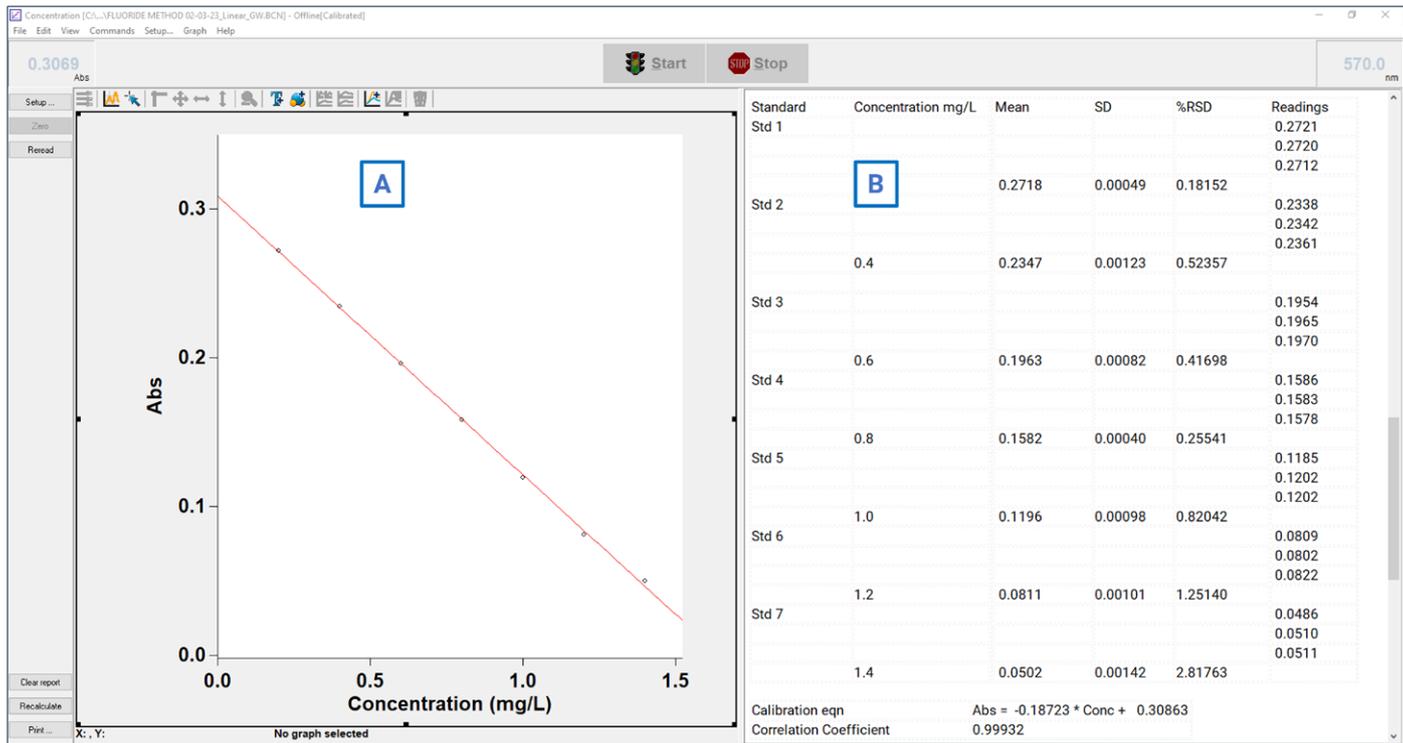


図 3. Agilent Cary WinUV ソフトウェアにより自動的に生成された検量線と濃度分析レポート

### 3. 定量メソッドを使用してサンプルを分析

定量メソッドを、前のセクションの説明に従って設定することにより、未知サンプルの分析がわずか数秒で実施できます。その妥当性を証明するために、内部調整された既知濃度（0.5 および 0.7 mg/L）のフッ化物サンプルを分析しました。570 nm での単一波長吸光度測定（3 回繰り返し分析）後、ソフトウェアにより自動的に検量線を適用し、各サンプルのフッ化物濃度を計算しました。ソフトウェアが生成した対応する結果レポートには、サンプル濃度、各スキャンの吸光度値、平均吸光度、相対標準偏差が記載されています（図 4）。

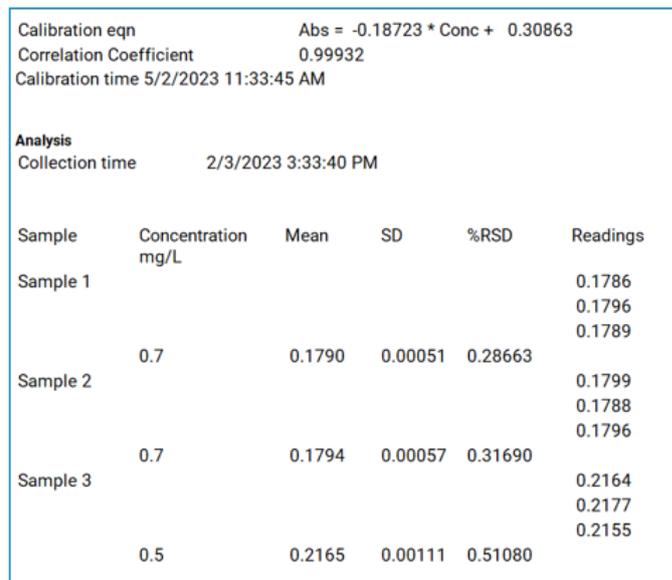


図 4. Agilent Cary WinUV ソフトウェアにより自動的に作成された濃度分析レポートのスナップショット

## SPADNS 比色分析法を用いた水サンプルの分析

前のセクションで説明したステップに従って、干渉イオンが存在しない水サンプルを分析できます。

**サンプル前処理：**干渉イオンはエラーの原因になりますが、こういったイオンは、EPA メソッド 340-1 に規定されている蒸留手法により除去できます。水サンプルに残留塩素が含まれている場合は、5.0 g の  $\text{NaAsO}_2$  を溶解して蒸留水で 1,000 mL に希釈して調製した 1 滴 (0.05 mL) の  $\text{NaAsO}_2$  溶液を添加することにより除去できます。

10 mL の混合済み酸-ジルコニル-SPADNS 溶液を (干渉イオンが存在しない) 50 mL の水に添加して十分に混合し、赤色の溶液を生成して分析します。前のセクションで説明した定量メソッドを使用して、水サンプルの 570 nm での単一波長吸光度測定を実施します。データ取り込み後に、ソフトウェアが自動的に検量線を使用してサンプル濃度を計算し、レポートを作成します。サンプルの吸光度が 0 ~ 1.4 mg/L という検量線の分析範囲を外れている場合は、サンプルを希釈して分析を繰り返します。

## 結論

Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計と Agilent Cary WinUV ソフトウェアにより、SPADNS 比色分析法に従った、水中のフッ化物を定量するための便利で使いやすいプラットフォームを実現しました。Agilent Cary WinUV の Concentration モジュールを使用して、フッ化物定量メソッドを作成しました。このソフトウェアは迅速かつ簡単に設定することができ、必要になるのはわずか数ステップのみです。SPADNS 比色分析法では、0 ~ 1.4 mg/L の分析範囲で直線性を規定しています。Cary WinUV の Concentration モジュールで作成した定量メソッドは、水サンプルの分析に直接適用できます。ソフトウェアが自動的にサンプル濃度を計算してレポートを作成するため、時間のかかるデータ解析手順が削減されます。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE26463005

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, October 24, 2023

5994-6187JAJP

## 参考文献

1. Guidelines for Drinking-Water Quality, 4th Edition WHO, **2011**.
2. Shahroom, N. B.; Mani, G.; Ramakrishnan, M. Interventions in Management of Dental Fluorosis, an Endemic Disease: A Systematic Review. *J. Family Med. Prim. Care* **2019**, *8(10)*, 3108.
3. Standard Methods 4500-F- A, B and D. Determination of Fluoride F- Spectrophotometric Method; Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, American Public Health Association.

## 詳細情報

- Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計
- Agilent Cary WinUV ソフトウェア
- お客様のニーズに最適な Agilent UV-Vis がわかります
- Agilent UV-Vis 分光光度計の使用法とアプリケーション
- Agilent UV-Vis 分光分析と分光光度計の FAQ