

デジタル画像のスペクトル変換を用いた環境水中の亜硝酸態窒素(N-NO₂)と化学的酸素要求量(COD)の測定¹⁾

Determinations of nitrite nitrogen (N-NO₂) and chemical oxygen demand (COD) in environmental water using spectrum conversion from digital color images

石原 勢太郎, 佐藤 由佳, 古賀 信吉*
広島大学大学院教育学研究科 自然システム教育学講座 化学教室

Seitaro ISHIHARA, Yuka SATO, and Nobuyoshi KOGA*

Chemistry Laboratory, Department of Science Education, Graduate School of Education, Hiroshima University
1-1-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8524, Japan.

*Corresponding author. e-mail: nkoga@hiroshima-u.ac.jp

Abstract

Using a technique of visible spectrum simulation from digital color image of test solution colored by an analytical reagent as a substitute of spectrophotometer, it was examined to introduce spectrophotometric method into student's activities on the environmental water analysis. As exemplified by the determinations of nitrite nitrogen (N-NO₂) and chemical oxygen demand (COD) in the environmental water, the details of the experimental procedures were investigated by referring the typical results of analyses. As the results, it was indicated that by simulating the visible spectra from the RGB values of colored test solutions the N-NO₂ and COD in the environmental water can be determined quantitatively by the spectrophotometric methods.

Keywords: Environmental water analysis, nitrate nitrogen, chemical oxygen demand, digital color image, spectrum conversion

1 はじめに

環境学習の一環として身近な河川や湖沼の水質調査活動を取り入れた授業実践が、小・中・高等学校において、また学校現場と大学との連携事業などにおいて行われている²⁾。これらの授業実践においては、試験紙やパックテストを用いた簡易分析法が広く用いられており、身近な自然に対する興味関心の喚起や環境保全の態度の育成を目的とした学習指導において有効に活用されている。一方、高等学校における化学教育の観点からは、分析反応や定量分析の原理を学習させる発展的教材として生徒による水質分析の定量化を図る意義も大きい。このような目的で、容量分析や比色計を用いた簡易吸光光度法による水質分析の教材的手法が検討されており³⁻⁸⁾、これらを用いた授業実践の報告も多い。また、高等学校と大学との連携事業等では、大学の設備である紫外可

視分光光度計を用いて本来の吸光光度法による定量分析を体験させる教育実践も行われている。

近年、デジタルカメラなどにより撮影した検液のデジタル画像から得られるピクセル値や RGB 値と検液濃度の関係を用いて、簡易吸光光度法として化学実験に応用した例が多数報告されている⁹⁻¹³⁾。学校現場における水質調査においても、ザルツマン法による亜硝酸態窒素(N-NO₂)の定量分析に、このようなデジタル画像を用いた簡易吸光光度法を適用した実践事例が報告されている¹²⁾。筆者らは、コンピュータグラフィックスの分野で検討されている RGB 値のスペクトル変換解析の方法¹⁴⁻¹⁶⁾を応用し、デジタル画像の RGB 値から可視吸収スペクトルをシミュレーションする方法を提案している¹¹⁾。この方法によると、分光光度計を用いた本来の吸光光度法と同様に極大吸収波長における吸光度を用いて検液濃度を決定することが可能であり、多色間の呈色変化に

も対応した吸光光度法として種々の化学実験への応用が期待される¹⁷⁻²⁰⁾。この RGB 値のスペクトル変換解析を応用した化学実験については、高等学校での利用を目的としてスペクトル変換手法の詳細と種々の化学実験への応用の可能性について、多くの問い合わせをいただいた。なかでも、水質調査活動における化学的酸素要求量 (COD) 測定への応用についての問い合わせが多く、COD 測定のための具体的な教材的手法の検討が必要であることを認識した。そこで、本研究では、パックテストで用いられている過マンガン酸カリウム塩基性法による COD 測定に RGB 値のスペクトル変換解析を応用し、吸光光度法により定量する方法を検討した。これまでに RGB 値を直接用いた方法により定量的な測定が可能であることが示されているザルツマン法による N-NO₂ の測定¹²⁾と比較しながら、分析操作の詳細と結果の概要を示し、学校現場での水質調査活動における教材的手法としての有用性を議論する。

2 実験方法

2.1 亜硝酸イオンの検量線

三角フラスコに種々の濃度 (0~2 mg NO₂⁻ L⁻¹) の亜硝酸ナトリウム水溶液を 10 mL ずつ分取した。それぞれにザルツマン試薬²¹⁾ 5 mL を加え、攪拌後 5 分間静置して検液とした。検液を光路長 10 mm のポリスチレン製のセルに入れ、分光法と変換法の 2 通りの方法で可視吸収スペクトルを得た。(1) 分光法：蒸留水を参照溶液とし、紫外可視分光光度計 (Shimadzu UVmini-1240) を用いて検液の可視吸収スペクトル (400~700 nm) を測定した。(2) 変換法¹¹⁾：発泡スチロール板で製作したサンプルホルダーに検液を入れたセルをはめ込み、汎用フラットヘッドスキャナ (EPSON GT-8700F) を用いて、検液のデジタル画像を得た。画像解析ソフト (KAnalyst フリーウェア) により、各検液のデジタル画像から RGB 各値の平均値を取得し、既報の方法¹¹⁾により可視吸収スペクトル (400~700 nm) をシミュレーションした。

分光法および変換法により得た可視吸収スペクトルの極大吸収波長における吸光度を用いて、濃度決定のための検量線を作成した。

2.2 COD の検量線

100 mL のメスフラスコに種々の濃度 (COD 0~100 mg O L⁻¹) のグルコース水溶液を 5 mL ずつ分取した。それぞれのメスフラスコに 2 mol L⁻¹ 水酸化ナトリウム水溶液 1 mL を加え、さらに 4×10⁻³ mol L⁻¹ 過マンガン酸カリウム水溶液 5 mL を加えた。3 分後に蒸留水で 100 mL に希釈し、検量線作成のための検液とした。それぞれの検液をポリスチレン製セル (光路長 10 mm) に入れ、2.1

と同様に分光法および変換法により得た可視吸収スペクトルを基にして、検量線を作成した。

2.3 水質分析

水道水、河川水、緑茶、味噌汁、および清涼飲料水を検液として、上述した方法により亜硝酸イオン濃度と COD を測定した。JIS 法²²⁾およびパックテストによる分析結果と比較して、本報の分析法の信頼性と教材的手法としての有用性を議論した。

3 結果と考察

3.1 亜硝酸イオンの検量線

図 1 に、種々の濃度の亜硝酸イオン標準溶液とザルツマン試薬の反応による呈色液の可視吸収スペクトルを示す。吸収スペクトルは、いずれの亜硝酸イオン濃度においても 543 nm 付近で極大吸収を示し、亜硝酸イオン濃度の増加に伴い極大吸収波長における吸光度が単調に増加する。これは、亜硝酸イオン濃度に依存した呈色変化が、単一色 ($\lambda_{\max}=543$ nm) の色濃度変化であることを示している。図 2 に、亜硝酸イオン濃度と呈色液のデジタル画像の RGB 値の関係を示す。亜硝酸イ

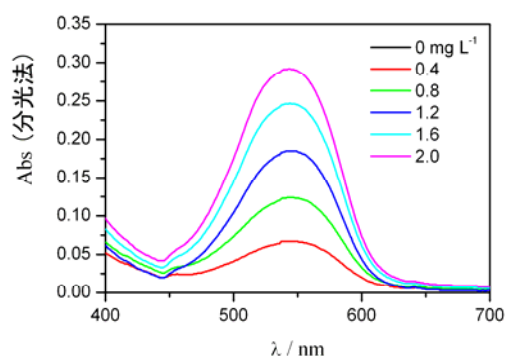


図 1 亜硝酸イオン標準溶液とザルツマン試薬による呈色液の可視吸収スペクトル (分光法)

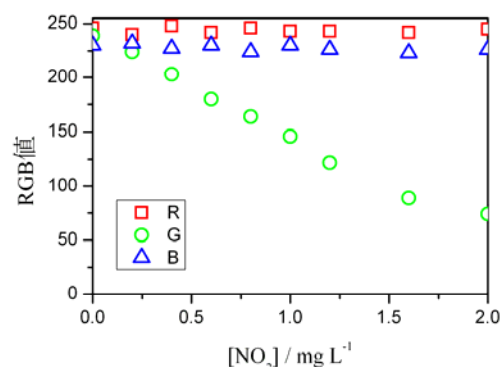


図 2 亜硝酸イオン濃度に依存した呈色液の RGB 値の変化

オン濃度の増加に伴い、G 値の減少が見られる。一方、R 値および B 値の変化は非常に小さい。これは、亜硝酸イオンとザルツマン試薬の反応による呈色が、RGB 表色系における G 値の基準スペクトルに近い波長で極大吸収を示す可視スペクトルの吸収によることを示している。

図 2 に示した各亜硝酸イオン濃度における呈色液の RGB 値を用いてスペクトル変換解析を行うと、図 3 に示すような可視吸収スペクトルが得られる。変換法によりシミュレーションしたスペクトルにおける吸光度の絶対値は、スキャナによる反射画像を用いたために図 1 の分光法による可視吸収スペクトルと大きく異なるが、極大吸収波長およびスペクトル形状はよく一致する。図 4 に、分光法および変換法により得た可視吸収スペクトルの極大吸収波長における吸光度と亜硝酸イオン濃度の関係を示す。JIS 法では、図 4 の分光法による直線相関を検量線として用いるが、変換法により作成した検量線においても直線関係が見られる。

3.2 COD の検量線

図 5 に、種々の濃度の COD 標準溶液と一定量の過マンガン酸カリウム水溶液を塩基性条件下

で反応させて得た検液の可視吸収スペクトルを示す。塩基性条件下では、赤紫色の過マンガン酸イオン MnO_4^- は、COD 標準溶液との反応により黄緑色のマンガン酸イオン MnO_4^{2-} に還元される²³⁾。



このため、COD 値の増加に伴い MnO_4^- による 525nm および 545nm に分裂した極大吸収波長の吸光度は減少し、 MnO_4^{2-} による 435 nm および 605 nm における吸光度が増加する。図 6 に、図 5 のスペクトル測定に用いた検液のデジタル画像から得た RGB 値の COD 値に依存した変化を示す。この場合、多色間の呈色変化であるために R、G および B 値のすべてにおいて COD 値に依存した変化が見られる。 MnO_4^- による呈色は、G 値の基準スペクトルに近い波長で極大吸収を示す可視スペクトルの吸収によるため、COD 値の増加に伴い G 値は増加する。一方、B 値および R 値の基準スペクトルの極大吸収は、それぞれ MnO_4^{2-} による吸収スペクトルの吸収極大波長である 435nm および 605nm に近接しているため、COD 値の増加による MnO_4^{2-} の生成量の増加に伴い B 値および R 値が減少する。

図 7 に、図 6 に示した RGB 値を用いて変換法によりシミュレーションした検液の可視吸収ス

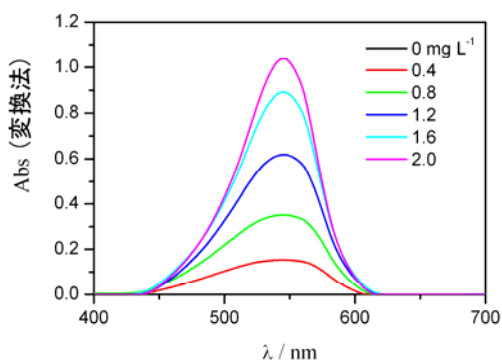


図 3 亜硝酸イオン標準溶液とザルツマン試薬による呈色液の可視吸収スペクトル(変換法)

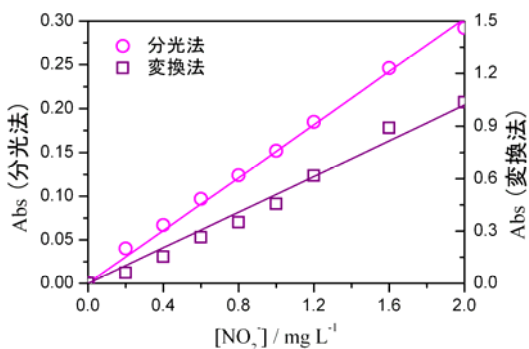


図 4 亜硝酸イオン濃度と吸光度 ($\lambda_{\text{max}}=543 \text{ nm}$) の関係

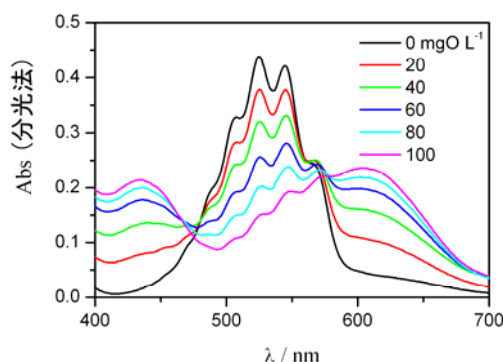


図 5 塩基性条件下での COD 標準溶液と KMnO_4 水溶液による呈色液の可視吸収スペクトル(分光法)

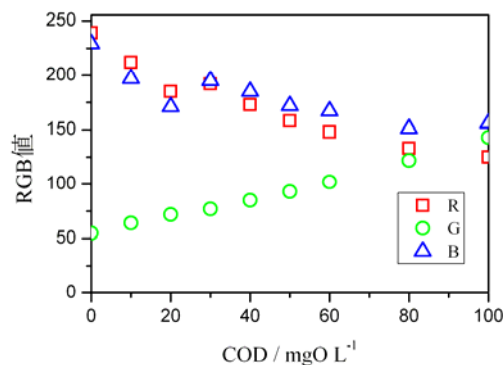


図 6 COD 値に依存した呈色液の RGB 値の変化

ペクトルを示す。変換法により得られる吸収スペクトルは、R、G、B およびその混合色である C、M、Y の基準スペクトルを RGB 各値の大小関係により重み付けして足し合わせたものである^{11,14)}。このため、変換法による MnO_4^- の吸収スペクトルでは、分光法で見られたピークの分裂を再現することはできない。しかしながら、変換法による吸収スペクトルの極大吸収波長 535nm は、分光法による分裂した二つの極大吸収のちょうど中間に位置し、全体としてのスペクトルの形状も類似している。また、COD 値が増加すると 450nm より短波長側および 600nm より長波長側の吸光度が増加し、還元生成した MnO_4^{2-} による吸収も再現している。

図 5 および図 7 に示した吸収スペクトルの COD 値による変化をもとにして COD 測定のための検量線を作成する場合、COD 値 0 の吸収スペクトルを基準として、極大吸収波長における吸光度の減少量 ΔAbs と COD 値との直線相関を用いることになる。図 8 に、分光法 ($\lambda_{\text{max}}=525 \text{ nm}$) および変換法 ($\lambda_{\text{max}}=535 \text{ nm}$) における COD 値と ΔAbs の関係を示す。いずれの方法により得られた検量線も良い直線性を示す。

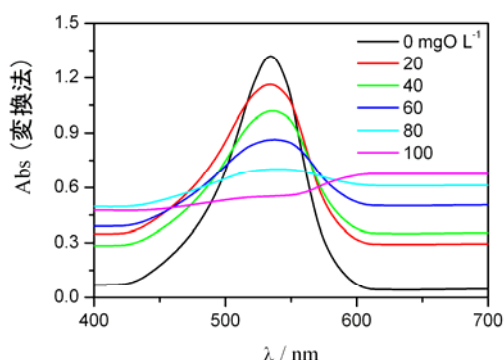


図 7 塩基性条件下での COD 標準溶液と KMnO_4 水溶液による呈色液の可視吸収スペクトル(変換法)

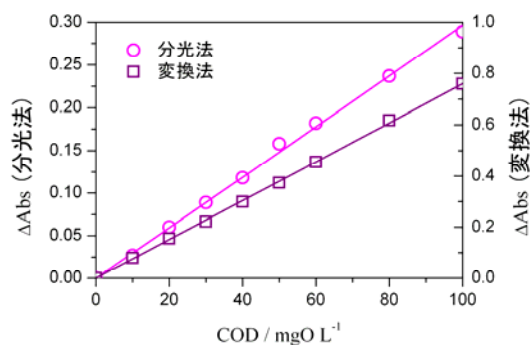


図 8 COD 値と ΔAbs (分光法: $\lambda_{\text{max}}=525 \text{ nm}$, 変換法: $\lambda_{\text{max}}=535 \text{ nm}$) の関係

3.3 RGB 値を用いた検量線

亜硝酸イオンの定量については、本報と同様にザルツマン試薬との反応により呈色した検液のデジタル画像から RGB 値を読み取り、G 値を反射率(あるいは透過率)として見立てることにより、次式から吸光度を求める方法が提案されている¹²⁾。

$$\text{Abs} = -\log_{10}(\text{G} / \text{G}_0) \quad (2)$$

本報で用いた変換法による吸収スペクトルのシミュレーションにおいて、図 2 に示したように $\text{G} < \text{B} < \text{R}$ の関係がある場合、波長 λ におけるスペクトル強度 $\text{I}(\lambda)$ は、リニア RGB 値(0-1)を用いて次式で表わされる^{11,14)}。

$$\text{I}(\lambda) = \text{G} + (\text{B}-\text{G}) \times \text{MS}(\lambda) + (\text{R}-\text{G}) \times \text{RS}(\lambda) \quad (3)$$

ここで、 $\text{MS}(\lambda)$ および $\text{RS}(\lambda)$ は、それぞれマゼンタ $\text{M}(\text{R}+\text{B})$ および R の基準スペクトルの λ における換算係数である。式(3)の関係と比較すると、式(2)の取り扱い、 λ を G の基準スペクトルの極大吸収波長としたうえで、吸収スペクトルへの R 値と B 値の寄与を無視して式(3)の第 1 項のみを考慮した扱いとなる。上述したように、ザルツマン法による亜硝酸イオンの呈色液の極大吸収は、 G 値の基準スペクトルの極大吸収と非常に近い波長で観測される。また、亜硝酸イオン濃度に依存した R 値および B 値の変化もほとんどないことから、式(2)による取り扱いは、式(3)の近似法としても妥当であると考えられる。

図 9 (a) に、亜硝酸イオン濃度と図 2 の G 値を用いて式(2)より求めた吸光度の関係を示す。図 4 に示した分光法および変換法により得た検量線に比べると回帰直線からの偏差が幾分か大きくなるが、亜硝酸イオン濃度の範囲を小さくしたり、検液の希釈率を大きくしたりすることにより、直

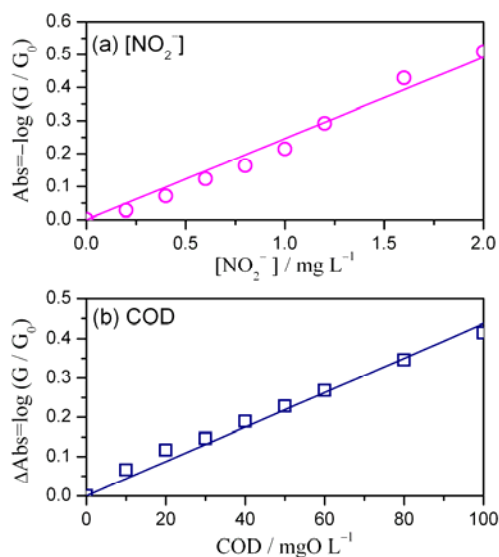


図 9 G 値による N-NO_2 と COD の検量線

表1 種々の手法を用いて得た身近な水溶液中の亜硝酸態窒素とCODの分析結果

検液	亜硝酸態窒素(mg NO ₂ ⁻ L ⁻¹)				COD (mgO L ⁻¹)				
	分光法 ^{*1}	変換法	G 値	パケット	JIS 法 ^{*2}	分光法	変換法	G 値	パケット
水道水	0	0.01	0.01	0	0.6	0.7	0.6	0	0~2
河川水 A	0.54	0.51	0.53	0.5	1.4	1.4	1.4	1.8	2
河川水 B	0.38	0.36	0.38	0.2~0.5	1.9	1.7	1.9	3.5	2
河川水 C	0.14	0.15	0.15	0.1~0.2	1.9	2.1	2.0	1.8	2
緑茶 ^{*3}	0.01	0.01	0.02	----	35	37	37	48.8	50
味噌汁 ^{*3}	0.01	0.03	0.03	----	13	12	12	18.1	13~20
清涼飲料水 ^{*3}	0	0.01	0.01	0	41	9.7	8.4	13.5	10

^{*1} JIS 法。

^{*2} KMnO₄ 酸性法(滴定法)。

^{*3} COD 測定においては希釈溶液を用いた。希釈率(緑茶:×10⁻², 味噌汁:×10⁻³, 清涼飲料水:×10⁻³)。

線性は改善できるものと思われる。式(2)と同様な取り扱いによる吸光度法を、1-10-フェナントロリンを用いた鉄(II)イオンの定量分析¹⁰⁾および黄色食品着色料の濃度決定¹³⁾に応用した例が報告されている。いずれの場合も、亜硝酸イオンの場合と同様の解釈によりスペクトル変換解析の近似法としてその妥当性を評価することができる。

一方、過マンガン酸カリウム塩基性法によるCOD測定の場合も、検液の極大吸収波長はG値の基準スペクトルの極大吸収に近い波長で観測されるが、COD値とともにR、G、およびB値のすべてが変化するために、変換法の近似としての式(2)による取り扱いには妥当性を欠く。比較のために、図6のG値を用いて式(2)より求めた吸光度差ΔAbsのCOD値に依存した変化を図9(b)に示す。この場合も、見かけ上は比較的良好な直線関係を示すが、図8に示した検量線と比較して、低濃度において回帰直線からの偏差が大きいことや検量線の傾きが小さくなることなど定量分析の結果に影響を及ぼすと考えられる違いが見られる。

3.4 水質調査への応用

表1に、上述した方法により得た身近な水溶液中における亜硝酸態窒素とCODの分析値をJIS法およびパケットによる結果と比較して示す²⁴⁾。亜硝酸態窒素においては、変換法およびG値を用いた近似法による分析値は、JIS法である分光法による結果とほぼ一致する結果が得られた。

一方、CODにおいては、分光法および変換法による分析値は、清涼飲料水の場合を除いてJIS法の過マンガン酸カリウム酸性法(滴定法)と良い一致を示す。これに対して、G値を用いた近似法では、JIS法、分光法、および変換法の分析値からの偏差が大きいことがわかる。清涼飲料水に対するJIS法による分析値とその他の方法による結果の違いは、酸性法と塩基性法による違いによると考えられる²⁵⁾。

3.5 教材的手法としての有用性

前述した例のように、種々の水質調査項目に対

する簡易測定法が、教材的手法として多数提案されている。学校現場における水質調査活動を含む学習においては、その目的や学習段階に応じて適切な簡易測定法を選択して学習指導計画を策定することができる。

本報で紹介したデジタル画像のスペクトル変換を用いた手法では、試薬により呈色させた検液のデジタル画像からRGB値を読み取ることにより容易に呈色液の可視吸収スペクトルを描画することができる。また、分光光度計を用いた本来の吸光度法と同様に、可視吸収スペクトルの極大吸収波長における吸光度を用いて検量線法により測定値を決定することができる。近年、スーパーサイエンスハイスクールなどの予算措置により一部の高等学校に紫外可視分光光度計が導入され、これらを用いた実験教材も開発されている²⁶⁾。本報で紹介した方法を用いると、分光光度計の設備のない多くの高等学校においても、このような実験教材を高等学校「化学Ⅱ」の課題研究のテーマとして有効に活用できるものと思われる。同様に、水質調査活動の分析手法として本報の吸光度法を用いることにより、検液の呈色にかかわる化学反応、電磁波のスペクトル、物質による電磁波の吸収、吸光度法による定量分析法などについての発展的学習を取り入れた高等学校「化学Ⅱ」課題研究の展開が期待される。

4 まとめ

亜硝酸態窒素とCODの測定は、それぞれザルツマン法および過マンガン酸カリウム塩基性法による呈色液のデジタル画像を用いて吸収スペクトルをシミュレーションすることにより、吸光度法による定量的な分析操作が可能である。ザルツマン法による亜硝酸態窒素の分析に対しては、G値を直接用いて吸光度を算出する既報の方法も、スペクトル変換法の近似法として妥当な方法である。これらの方法は、学校現場における水質調査を通じた化学の学習活動において有効に活用できるものと思われる。

謝 辞

本研究の一部は、科学研究費補助金基盤研究(B)18300267 および(C)18500667 による。

参考文献と注釈

- 1) 一部を日本化学会第 87 回春季年会(関西大学, 2007 年 3 月 25~28 日)において発表した。講演番号 1H2-49.
- 2) 例えば, 環境省総合環境政策局環境教育推進室 編, 環境学習 2001 年号, 特集「水をテーマにした環境教育・環境学習の展開」, 社団法人環境情報科学センター, 2001.
- 3) 氷川 元, 「自作簡易比色計による環境分析」, 化学と教育, **41**, 762-765(1993).
- 4) 紺野 昇, 「パソコンを用いた自作比色計による COD 測定」, 化学と教育, **44**, 608-609(1996).
- 5) 上田晃嗣, 原 稔, 「COD の簡易測定法の開発」, 化学と教育, **46**, 656-659(1998).
- 6) 黒川伸二, 筒井浩司, 前田友和, 成富利英, 「環境学習のための COD 簡易測定法の開発」, 化学と教育, **48**, 764-767(2000).
- 7) 紺野 昇, 杉本良一, 芝本和代, 「パソコンを用いた比色計による環境調査の教材化 — 大気中の粉塵調査とその実践 —」, 科学教育研究, **24**, 240-247(2000).
- 8) 松川 寛, 田口さと子, 「ピペットを用いた COD 測定の簡略化」, 化学と教育, **53**, 710-713(2005).
- 9) 田口哲, 笠野恵子, 「CCD カメラとコンピュータを用いた画像解析法による反応速度測定教材の開発」, 化学と教育, **49**, 158-159(2001).
- 10) 菊池洋一, 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, **50**, 714-717(2002).
- 11) 古賀信吉, 宇都岡貴秀, 「RGB 値のスペクトル変換による簡易可視分光法の化学実験への応用」, 化学と教育, **52**, 771-774(2004).
- 12) 小池守, 高津戸秀, 「自作の画像解析ソフトウェアとスキャナを用いた水質調査の教材化 — 河川水中の亜硝酸イオン濃度の測定実験を通して —」, 理科教育学研究, **46**, 25-31(2006).
- 13) S.K. Kohl, J.D. Landmark, and D.F. Stickle, “Demonstration of Absorbance Using Digital Color Image Analysis and Colored Solutions”, *J. Chem. Educ.*, **83**, 644-646(2006).
- 14) B. Smits, “An RGB to Spectrum Conversion for Reflectances”, *J. Graphics Tools*, **4**, 11-22(1999).
- 15) Y. Sun et. al., “Deriving Spectra from Colors and Rendering Light Interface”, *IEEE Computer Graphics Appl.*, **19**, 61-67(1999).
- 16) 芳信孝宏, 真鍋知久, 金田和文, 山下英生, 「RGB 画像からのスペクトル変換手法」, *Visual Computing グラフィックスと CAD 合同シンポジウム 2003*, 北九州, 2003, pp.159-164.
- 17) 井上正之, 古賀信吉, 石原勢太郎, 「PVC シートを用いたベンゼンスルホン酸の検出と簡易定量」, 化学と教育, **54**, 359-361(2006).
- 18) 井上正之, 古賀信吉, 「ベンゼンのマイクロスケールスルホン化」, 化学と教育, **54**, 496-499(2006).
- 19) 坂本一磨, 石原勢太郎, 古賀信吉, 「デジタル画像のスペクトル変換解析を用いた吸光光度法による過酸化水素の分解反応の追跡」, 化学と教育, **55**, 528-531(2007).
- 20) N. Koga, “Simulation of Visible Spectra from Digital Color Image and its Application to Chemical Experiments at High Schools”, *Proc. 2nd. NICE Symposium, Taipei 2007*, pp.77-82. <http://dochoonho.sunchon.ac.kr/NICE2/2ndNICE-Papers/2ndNICE-oral/00013%20Nobuyoshi%20KOGA.pdf>
- 21) スルファニル酸 0.48 g と N-1-ナフチルエチレンジアミンニ塩酸塩 0.71 g を蒸留水に溶解した後, 0.6 mol L⁻¹-塩酸 10mL を加え, さらに蒸留水を加えて 250 mL に希釈した。
- 22) 日本規格協会編, *JIS ハンドブック環境測定 II*, 日本規格協会, 2006.
- 23) 高木誠司, *定量分析の実験と計算, 2 容量分析法(改訂版)*, 共立出版, 1969.
- 24) それぞれの検液に対する分光法および変換法による分析値は, 同一の呈色液に対する測定結果を示す。また, 変換法および G 値法による分析値は, 同一のデジタル画像から得た同一の RGB 値を用いて得た結果を示す。これらの分析値の算出には, それぞれ図 4, 図 8, および図 9 に示した検量線を用いた。
- 25) 日本分析化学会北海道支部, *水の分析*, 化学同人, 1971.
- 26) 梶山正明, 「スーパーサイエンスハイスクールにおける実験教材の開発」, 化学と教育, **52**, 592-595(2004).