

修士論文

簡易な化合物濃度測定法の開発と
高校探究学習での活用

令和3年度

教育学研究科 理数・生活系教育領域

長谷川駿介

目次

要旨

第1章 緒論

第2章 様々な化合物濃度の比色定量分析

第1節 目的

第2節 材料と方法

2-2-1 ヨウ素でんぷん反応によるでんぷん濃度の検量線の作成

2-2-2 アミラーゼによるでんぷん分解反応

2-2-3 DNS 法による還元糖濃度の定量

2-2-4 ザルツマン試薬を用いた亜硝酸濃度の定量

2-2-5 過マンガン酸カリウムを用いた COD 測定

2-2-6 亜硝酸濃度定量の誤差範囲の算出

第3節 結果

2-3-1 ヨウ素でんぷん反応の呈色による検量線の作成

2-3-2 検量線を用いたアミラーゼのでんぷん分解活性の定量

2-3-3 DNS 法による還元糖濃度の定量

2-3-4 ザルツマン試薬を用いた亜硝酸濃度の定量

2-3-5 過マンガン酸カリウムを用いた COD 測定

2-3-6 亜硝酸濃度定量の誤差範囲の算出

第4節 考察

第5節 図表

第3章 本研究手法とパックテストの正確性・精度の比較

第1節 目的

第2節 材料と方法

3-2-1 亜硝酸濃度測定のパックテストの測定の正確性の検証

3-2-2 COD 測定のパックテストの測定の正確性の検証

3-2-3 亜硝酸濃度測定のパックテストと本研究手法の正確性の比較

第3節 結果

3-3-1 亜硝酸濃度測定のパックテストの測定の正確性の検証

3-3-2 COD 測定のパックテストの測定の正確性の検証

3-3-3 亜硝酸濃度測定のパックテストと本研究手法の正確性・精度の比較

第4節 考察

第5節 図表

謝辞

参考文献

第1章 緒論

高等学校学習指導要領の改訂によってこれまで「総合的な学習の時間」として実施されてきた科目が「総合的な探究の時間」に変更される。それに加えて、2022年から実施される高等学校学習指導要領においては「古典探究」「地理探究」「日本史探究」「世界史探究」「理数探究基礎」「理数探究」の6つの探究科目が設置される(高等学校学習指導要領)。これらのことから、今後の学校教育では「探究型学習」が重視されていくと考える。この「探究型学習」とは単に暗記するだけの勉強ではなく、自ら立てた問いの課題解決をするために、情報収集等のプロセスを立てながら解決へと導く能力を育てていく学習のことである。今回の「探究型学習」を重視した学習指導要領の改訂の経緯として、生産年齢人口の減少、グローバル化の進展や絶え間ない技術革新等により、社会構造や雇用環境は大きく、また急速に変化しており、予測が困難な時代となっているということが挙げられる。また、急激な少子高齢化が進む中で成熟社会を迎えた日本において、一人一人が持続可能な社会の担い手として、その多様性を原動力とし、質的な豊かさを伴った個人と社会の成長につながる新たな価値を生み出していくことが期待される。こうした変化の一つとして、進化した人工知能(AI)が様々な判断を行ったり、身近な物の働きがインターネット経由で最適化されるIoTが広がったりするなど、Society5.0とも呼ばれる新たな時代の到来が、社会や生活を大きく変えていくとの予測もなされている。また、情報化やグローバル化が進展する社会においては、多様な事象が複雑さを増し、変化の先行きを見通すことが一層難しくなっている(高等学校学習指導要領 総説)。このような時代にあつて、学校教育には、子供たちが様々な変化に積極的に向き合い、他者と協働して課題を解決していくことや、様々な情報を見極め、知識の概念的な理解を実現

し、情報を再構成するなどして新たな価値につなげていくこと、複雑な状況変化の中で目的を再構築することができるようにすることが求められている。このような要因から、「探究型学習」というものが学校教育において大きく取り上げられ、生徒のより主体的な学習活動を促すことができるようになっていくと考える。それに加えて、一般社団法人日本経済団体連合会が2018年に行った「高等教育に関するアンケート結果」には産業界が学生に身に付けていることを期待する資質、能力、知識という設問がある。この結果として、文系・理系ともに、「主体性」「実行力」「課題設定・解決能力」の順に1位、2位、3位であった。このような社会が学生に求める資質、能力、知識はまさに「探究型学習」で育成することのできるスキルであり、高等学校の学習指導要領の改訂に至った要因の1つであると考えられる。

本研究では、今回の高等学校学習指導要領の改訂で新設された探求科目の中でも、「理数探究基礎」「理数探究」について焦点を当てていく。「理数探究基礎」「理数探究」は様々な事象に関わり、数学的な見方・考え方や理科の見方・考え方を組み合わせるなどして働かせ、探究の過程を通して、課題を解決するために必要な資質・能力を育成する科目である。この科目の目標としては(1)対象とする事象について探究するために必要な知識及び技能を身に付けるようにする。(2)多角的、複合的に事象を捉え、数学や理科などに関する課題を設定して探究し、課題を解決する力を養うとともに創造的な力を高める。(3)様々な事象や課題に主体的に向き合い、粘り強く考え行動し、課題の解決や新たな価値の創造に向けて積極的に挑戦しようとする態度、探究の過程を振り返って評価・改善しようとする態度及び倫理的な態度を養うという3つが挙げられている。これらの目標を達成しつつ、様々な事象についての探究の過程を通して、探究の意義、探究の過程、研究倫理について理解させるとともに、観察、実験、調査等につい

での技能, 事象を分析するための技能, 探究した成果などをまとめて発表するための技能を身に付けさせ, 思考力, 判断力 表現力等を育成することが狙いとなっている(高等学校学習指導要領)。

この高等学校学習指導要領の改訂によってすべての高等学校において、課題研究・探究学習が行われていくことになる。このような、探究学習を先駆けて行っている SSH という取り組みがある。SSH とはスーパーサイエンスハイスクールの頭文字をとったものであり、将来の国際的な科学技術関係人材を育成するため、先進的な理数教育を実施する高等学校等を「スーパーサイエンスハイスクール」として指定し、学習指導要領によらないカリキュラムの開発・実践や課題研究の推進、観察・実験等を通じた体験的・問題解決的な学習等を平成 14 年度から文部科学省が支援を行っている事業である。私は 2020 年度から 2021 年度にかけて、SSH の指定校である三重県立松阪高等学校の SSH の課題研究における TA を行ってきた。その探究活動の中で化合物の濃度を測定するような実験を多く扱う。また、他の SSH 指定校における先行研究でも環境水中の化合物濃度の定量や食品中の化合物濃度の定量などを行っている実験例が多く見受けられる。高等学校には分光光度計などといった高価な化合物濃度測定装置はなく、連携をしている大学や研究機関で分光光度計を利用するか、パックテスト(共立理化学研究所)などの簡易な測定キットでおおよその値を算出するなどの方法をとっている。

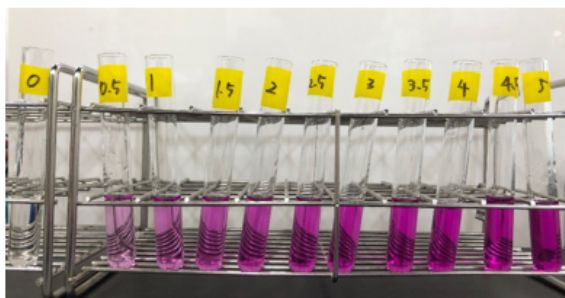
現在は SSH 指定校だけがこのような課題研究を行っているが、学習指導要領の改訂ですべての高等学校が同様の課題研究を行うようになる。SSH 指定校であれば、連携している大学や研究機関があるかもしれないが、すべての高等学校がそのような連携機関をもっているわけではない。大学や研究機関もすべての高等学校に実験装置などを貸し出すのは不可能である。また、パックテストなど簡

易測定キットでは微妙な化合物濃度の変化を溶液の呈色の変化で判断することが難しく、それに加えて、化合物濃度の測定範囲は限定的なものが多い。

したがって、すべての高等学校にある器具・設備を用いて化合物濃度を測定することのできる教材を提案することが、今後の高等学校における探究学習において有用だと考えた。本研究は、すべての高等学校にあるスキャナー・複合機・パソコン・フリーの画像解析ソフトを用いて化合物濃度測定を行う方法を発案し、その有用性を検証する（図1）。

本研究で提案する簡易な化合物濃度測定イメージ

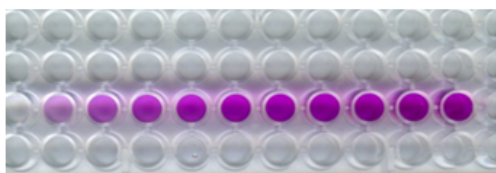
1. 呈色のある反応



2. 学校にあるスキャナ (複合機)で画像取得



3. 色調の抽出



パソコンを用いた色調の抽出

4. 濃度算出



図1：本研究で提案する簡易な化合物濃度測定

本研究手法は4つのステップに分けることができ、それぞれのステップにおいてどのような操作を行うのかをまとめたもの

第2章 様々な化合物濃度の比色定量分析

第1節 目的

化合物の濃度は、例えば、その化合物の呈色反応溶液の特定波長での吸光度を測定することで評価できる。その際には、ある程度直線的で傾きのある検量線を作成することが必要となる。たとえば、ヨウ素液はでんぷんと反応することによって青紫色に呈色し、でんぷん濃度によってその呈色の濃淡が変化する。でんぷん濃度の定量は分光光度計を用いて行うことができる。分光光度計は吸光度 (Abs) を測定することのできる装置であり、この吸光度を用いて検量線を作成し、それによって濃度未知のでんぷん溶液の濃度やでんぷん分解酵素の分解活性を算出することができる。しかしながら、分光光度計は高価な装置であり、高等学校が購入することは難しい。

本章では、前述したでんぷん分解酵素であるアミラーゼによるでんぷん分解活性測定、還元糖濃度の DNS 試薬を用いた測定、高等学校の探究学習において水質調査や大気汚染調査などに応用することのできる亜硝酸濃度測定・COD 測定について、本研究で提案する簡易な化合物濃度測定法によって化合物濃度の定量が可能であるかを検証することやその測定結果の正確性の検証を目的とした。

第2節 材料と方法

2-2-1 ヨウ素でんぷん反応によるでんぷん濃度の検量線の作成

10.0gの可溶性でんぷん（関東化学株式会社）を沸騰させた蒸留水1000mlに加え、溶け残りがなくなるまでスターラーで攪拌し、1.0%でんぷん溶液を作成した。作成した1.0%でんぷん溶液を0%から1.0%の範囲で0.1%ごとに段階希釈し、11本の試験管に10mlずつ分注した。各試験管のでんぷん溶液に30 μ lのヨウ素液（2% KI、1% I₂）を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。ヨウ素でんぷん反応によって呈色したそれぞれの濃度の溶液を96ウェルプレートに200 μ lずつ分注し、スキャナー（EPSON GT-X700）を用いてデジタル画像を作成した。同様の手順で、0.1%のでんぷん溶液を作成し、0%から0.1%の範囲で0.01%ごとに段階希釈し、作成した溶液を用いて、デジタル画像を作成した。0%から0.1%の溶液についてはでんぷん溶液の濃度による色の変化が確認しづらかったため、ヨウ素液を20 μ l加えたものと、30 μ l加えたものの2種類を作成した。0%から0.01%の溶液についてはヨウ素液を30 μ l加えた。

フリーソフト Image J を用いて、デジタル画像中のそれぞれのセルの中心にカーソルを合わせることで RGB 値を抽出した。各 RGB 値を用いてスペクトル変換解析を行った。まず、抽出したそれぞれの RGB 値をモニター RGB 値とした。モニター RGB 値を 256 で割ることで、実数値（0~1）としてのモニター RGB 実数値を算出した。算出したモニター RGB 実数値を 2.2 乗し、この値をリニア RGB 値とした。リニア RGB 値の大小関係を比較し、「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 古賀ら、2004」で示されている判別式（1）～（6）に各値を代入し、RGB スペクトル変換値を算出した。判別式で用いた WS (λ), CS (λ), MS (λ), YS (λ), RS (λ), GS (λ), BS (λ) の

各値は、古賀らの論文中に示されている基準スペクトル (図 2) の解析したい波長に該当する値を代入し、 $WS(\lambda)$ は 1.0 とした。例えば、525nm でスペクトル変換解析を行う場合は RGB それぞれにはリニアRGB 値、判別式のそれぞれの値には $WS(\lambda) = 1.0$, $CS(\lambda) = 1.0$, $MS(\lambda) = 0$, $YS(\lambda) = 0.9$, $RS(\lambda) = 0$, $GS(\lambda) = 1.0$, $BS(\lambda) = 0.05$ という数値を判別式のそれぞれに代入する (図 2)。また、本研究では基準スペクトルの変化が比較的大きい 425nm, 450nm, 475nm, 500nm, 525nm, 550nm, 575nm, 600nm での RGB スペクトル変換値の算出を行った。算出した RGB スペクトル変換値について対数変換を行うことによって、ヨウ素でんぷん反応の呈色による検量線の作成を行った (古賀ら、2004)。

「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 古賀ら、2004」で示されている判別式

(1) $R < G < B$ の場合

$$It(\lambda) = R \times WS(\lambda) + (G - R) \times CS(\lambda) + (B - G) \times BS(\lambda)$$

(2) $R < B < G$ の場合

$$It(\lambda) = R \times WS(\lambda) + (B - R) \times CS(\lambda) + (G - B) \times GS(\lambda)$$

(3) $G < R < B$ の場合

$$It(\lambda) = G \times WS(\lambda) + (R - G) \times MS(\lambda) + (B - R) \times BS(\lambda)$$

(4) $G < B < R$ の場合

$$It(\lambda) = G \times WS(\lambda) + (B - G) \times MS(\lambda) + (R - B) \times RS(\lambda)$$

(5) $B < R < G$ の場合

$$It(\lambda) = B \times WS(\lambda) + (R - B) \times YS(\lambda) + (G - R) \times GS(\lambda)$$

(6) $B < G < R$ の場合

$$It(\lambda) = B \times WS(\lambda) + (G - B) \times YS(\lambda) + (R - G) \times RS(\lambda)$$

2-2-2 アミラーゼによるでんぷん分解反応

1.0g の可溶性でんぷん（関東化学株式会社）を沸騰させた蒸留水 1000ml に加え、溶け残りがなくなるまでスターラーで攪拌し、0.1% でんぷん溶液を作成し、10ml ずつ 11 本の試験管に分注した。そして、1L の超純水に α -アミラーゼ（FUJIFILM）1g を溶かしたものを酵素溶液として用意した。すべての試験管を 40℃ に設定した恒温水槽でインキュベートし、0 分から 10 分まで 1 分刻みで反応時間を設定し、それぞれに酵素溶液を 600 μl ずつ加え、それぞれ設定した反応時間で酵素反応させた。同様の手順で、酵素溶液を 60 μl 加えた実験も行った。設定した反応時間に達したところで 1M HCl aq を 1ml 加え、反応を停止させた。反応停止後にすぐにヨウ素液を加え、ヨウ素でんぷん反応による呈色を確認した。酵素溶液を 600 μl 加えた実験では、ヨウ素液を加える量を 30・40 μl の 2 種類作成し、それぞれについてデジタル画像の作成を行った。酵素溶液を 60 μl 加えた実験ではヨウ素液を 30 μl 加えたものを用いてデジタル画像の作成を行った。反応時間ごとの溶液を 200 μl ずつ 96 ウェルプレートに分注し、スキャナー（EPSON GT-X700）を用いてデジタル画像を作成した。各酵素反応溶液についてのスペクトル変換解析は 2-2-1 と同様に行った。算出したスペクトル変換値を 2-2-1 で作成したヨウ素でんぷん反応の呈色についての検量線の近似式に代入することによって、酵素反応時間ごとの溶液のでんぷん濃度を算出した。

2-2-3 DNS 法による還元糖濃度の定量

5.0g のグルコース（ナカライテスク株式会社）を蒸留水 1000ml に溶かし、0.5% グルコース溶液を作成した。作成した 0.5% グルコース溶液を段階希釈し、0% から 0.5% まで 0.1% 刻みで 6 段階の濃度のグルコース溶液を作成した。各濃度のグルコース溶液を 300 μl ずつチューブに分注し、そこに DNS 試薬（3, 5-

Dinitrosalicylic acid 3.5g、NaOH 9.9g) を 900 μl ずつ加えて、5 分間煮沸した。煮沸後、それぞれの溶液を 200 μl ずつ 96 ウェルプレートに分注し、スキャナー (EPSON GT-X700) を用いて、デジタル画像を作成した。各濃度のグルコース溶液についてのスペクトル変換解析は 2-2-1 と同様に行った。算出した RGB スペクトル変換値について対数変換を行うことによって、各濃度のグルコース溶液についての検量線の作成を行った。

2-2-4 ザルツマン試薬を用いた亜硝酸濃度の定量

10 mgの亜硝酸ナトリウム (林純薬工業株式会社) を蒸留水 2L に溶かし、5 mg/L の亜硝酸ナトリウム水溶液を作成した。作成した 5 mg/L の亜硝酸ナトリウム水溶液を段階希釈し、0mg/L から 5mg/L まで 0.5mg/L ごとに 11 段階の濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液を調整した。それぞれの濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液を試験管に 2ml ずつ分注し、それぞれにザルツマン試薬 (林純薬工業株式会社) を 1ml ずつ加えた後、攪拌し、5 分間静置した。それぞれの濃度の溶液を 96 ウェルプレートに 200 μl ずつ分注し、スキャナー (EPSON GT-X700) を用いてデジタル画像を作成した。

各濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液についてのスペクトル変換解析は 2-2-1 と同様に行った。算出した RGB スペクトル変換値について対数変換を行うことによって、ザルツマン試薬と亜硝酸ナトリウムの呈色による検量線の作成を行った。

2-2-5 過マンガン酸カリウムを用いた COD 測定

100 mgのグルコース (ナカライテスク株式会社) を蒸留水 1L に溶かし、100 mg/L のグルコース溶液を作成した。作成した作成した。100 mg/L のグルコース溶

液を段階希釈し、0mg/L から 100mg/L まで 10mg/L ごとに 11 段階の濃度のグルコース溶液を調整した。作成したそれぞれの濃度のグルコース溶液を 100ml ビーカーに 5ml ずつ分取した。各濃度のグルコース溶液の入ったビーカーに 1mol/L の水酸化ナトリウム水溶液を 2ml ずつ加え、攪拌した。その後、 4.0×10^{-3} mol/L の過マンガン酸カリウム水溶液を 5ml 加えて攪拌し、30 分間静置し、過マンガン酸カリウム水溶液による色の変化を確認した。反応後、溶液の全量を 25ml、50ml、75ml、100ml となるよう蒸留水で希釈し、それぞれの溶液を 96 ウェルプレートに 200 μ l ずつ分注し、スキャナー (EPSON GT-X700) を用いてデジタル画像を作成した。

作成したデジタル画像についてのスペクトル変換解析は 2-2-1 と同様に行った。算出した RGB スペクトル変換値について対数変換を行うことによって、各濃度・各希釈度のグルコース溶液と過マンガン酸カリウム水溶液の反応による呈色の変化による検量線の作成を行った。

2-2-6 亜硝酸濃度定量の誤差範囲の算出

2-2-4 と同様に 10 mg の亜硝酸ナトリウム (林純薬工業株式会社) を蒸留水 2L に溶かし、5 mg/L の亜硝酸ナトリウム水溶液を作成した。作成した 5 mg/L の亜硝酸ナトリウム水溶液を段階希釈し、0mg/L から 5mg/L まで 0.5mg/L ごとに 11 段階の濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液を調整した。この 0mg/L から 5mg/L まで 0.5mg/L ごとに 11 段階の濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液を 5 セット作成した。それぞれの亜硝酸ナトリウム水溶液を試験管に 1ml ずつ分注し、それぞれにザルツマン試薬 (林純薬工業株式会社) を 0, 5ml ずつ加えた後、攪拌し、5 分間静置した。それぞれの濃度の溶液を 96 ウェルプレートに 200 μ l ずつ分注し、スキャナー (EPSON GT-X700) を用いてデジタル画像を作成した。

各濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液についてのスペクトル変換解析は 2-2-1 と同様に行った。算出した RGB スペクトル変換値について対数変換を行うことによって、ザルツマン試薬と亜硝酸ナトリウムの呈色によるスペクトル変換値を 5 セットのそれぞれの濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液について算出し、5 つの試料のスペクトル変換値の平均値を用いて、検量線の作成を行った。

また、作成した検量線の近似式を用いて、それぞれの亜硝酸ナトリウム水溶液について、スペクトル変換値による濃度算出を行い、それぞれの濃度における算出濃度の誤差範囲を求めた。

第3節 結果

2-3-1 ヨウ素でんぷん反応の呈色による検量線の作成

でんぷん濃度 0%から 1.0%まで 0.1%ごとに段階希釈した溶液 10ml に、ヨウ素液を 30 μl 加えたものと、0%から 0.1%まで 0.01%ごとに段階希釈した溶液 10ml に、ヨウ素液を 20 μl ・30 μl 加えたものを検量線作成のための試料溶液として用意した (図 3)。それぞれの溶液についてデジタル画像を作成し、その画像から RGB 値を抽出し、スペクトル変換解析を行い、吸光度 Abs (λ) を算出することによって検量線を作成することを試みた。この実験結果から、0.1%から 1.0%の濃度のでんぷん溶液についてはヨウ素でんぷん反応の呈色の変化が目視でもわかりづらく、検量線も 0%から 0.1%の濃度までは直線的なグラフを得たが、0.1%以降は検量線となるようなグラフも作成できないことが分かった (図 4)。このことから、0.1%以上の濃度をヨウ素でんぷん反応の呈色の変化で判断することは難しく、RGB 値を抽出し、スペクトル変換解析を行うことによっても傾きのある直線的なグラフを得ることはできないということがわかった。また、0%から 1.0%の濃度のでんぷん溶液に対してヨウ素液を加える量を調整しても、でんぷん濃度 0%から 0.1%のような呈色の濃淡は確認できなかった。一方、0%から 0.1%の濃度のでんぷん溶液とヨウ素でんぷん反応の呈色について作成した検量線では、傾きがあり、ある程度直線的なグラフを得ることができた (図 5)。

2-3-2 検量線を用いたアミラーゼのでんぷん分解活性の定量

0.1%の濃度のでんぷん溶液に酵素溶液として α -アミラーゼを加え、酵素活性を算出することを試みた。今回の実験では、酵素溶液を 600 μl 加えたものと 60

μl 加えたものの 2 パターンで行った。酵素溶液を 600 μl 加えた実験では、ヨウ素液を加える量を調整しても、反応時間ごとにヨウ素でんぷん反応の呈色の濃淡を確認することができなかった (図 6)。このことから、今回作成した酵素溶液を 600 μl 加えると反応時間 1 分間以内に 0.1%でんぷんのほとんどすべて分解されてしまうことがわかった。一方、酵素溶液を 60 μl 加えた実験では、酵素反応時間が長くなるにつれて、ヨウ素でんぷん反応の呈色が淡くなっていくことが確認できた。よって、今回の実験においては、酵素溶液を加える量は 60 μl 、ヨウ素液を加える量は 30 μl で実験を行うと、酵素反応時間ごとのヨウ素でんぷん反応の呈色の濃淡の変化を確認することができるとわかった。2-2-1 で作成した検量線を用いて、この実験結果から反応時間ごとのでんぷん濃度を算出することができた。でんぷん濃度の推移を示したグラフ (図 7) から、酵素反応時間 3 分あたりまでに急激に酵素によるでんぷん分解が進んでいるということがわかった。また、酵素反応時間 2 分半ほどで溶解しているでんぷんの約 50%が分解されていることがわかった。酵素反応時間 3 分以降は緩やかにでんぷん分解が進み、酵素反応時間 10 分ほどで溶解しているすべてのでんぷんが酵素によって分解されることがわかった。以上の通り、アミラーゼのでんぷん分解活性をスペクトル変換解析を用いることによって算出できることがわかった。

2-3-3 DNS 法による還元糖濃度の定量

DNS 試薬を用いた還元糖濃度の検量線は直線的で傾きのあるグラフになったため、0%から 0.5%の濃度のグルコース溶液について本研究手法を用いてグルコース濃度を定量することができるとわかった (図 8, 9)。

2-3-4 ザルツマン試薬を用いた亜硝酸濃度の定量

0mg/L から 5mg/L の亜硝酸ナトリウム水溶液を、ザルツマン試薬と反応させ、その呈色から算出したスペクトル変換値を用いて、亜硝酸ナトリウム水溶液の検量線を作成することができた。直線的な検量線を作成できており、この濃度範囲の亜硝酸濃度を定量する実験において、本手法は応用可能であるとわかった (図 10, 11)。

2-3-5 過マンガン酸カリウムを用いた COD 測定

0mg/L から 80mg/L までのグルコース溶液について検量線を作成することができた。一方で、80mg/L 以上のグルコース溶液については直線的で傾きのあるグラフを作成することができなかった。したがって、本研究手法を用いて COD 測定を行うことができるグルコース溶液の濃度範囲は、0mg/L から 80mg/L であることがわかった (図 12, 13)。

2-3-6 亜硝酸濃度定量の誤差範囲の算出

5セットの 0mg/L から 5mg/L の亜硝酸ナトリウム水溶液を、ザルツマン試薬と反応させ、その呈色から算出したスペクトル変換値の平均値を用いて、亜硝酸ナトリウム水溶液の検量線を作成することができた。(図 14, 15) 作成した検量線の近似式にそれぞれの濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液のスペクトル変換値を代入し、濃度算出を行うことができた。また、算出した濃度の誤差範囲をそれぞれの濃度について算出することができた。(図 16)

第4節 考察

0%から 1.0%の濃度のでんぷん溶液については目視でもヨウ素でんぷん反応の呈色の変化がほとんどわからなかったが、0%から 0.1%の濃度のでんぷん溶液についてはヨウ素でんぷん反応の呈色がでんぷん濃度が上がるにつれて濃い青紫色になっていることが確認できた。また、0%から 1.0%の濃度のでんぷん溶液については検量線を作成することができなかったが、0%から 0.1%の濃度のでんぷん溶液については傾きがあり、ある程度直線的なグラフを得ることができた。これらのことから、目視で呈色の濃淡がある程度確認できるような場合について、このスペクトル変換解析を用いた検量線の作成が応用可能なのではないかと考える。

ザルツマン試薬と種々の濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液の呈色の関係は、でんぷん溶液とヨウ素液によるヨウ素でんぷん反応の呈色の関係と似ており、呈色は単色であり、溶液の濃度によってその呈色の濃淡が変化するというものであった。しかし、DNS 試薬と種々の濃度のグルコース溶液の呈色、過マンガン酸カリウム水溶液と種々の濃度のグルコース溶液の呈色は単色の濃淡変化ではなく、色の変化が伴うような呈色反応であった。DNS 試薬と種々の濃度のグルコース溶液の呈色であれば、グルコース溶液の濃度が低いものであれば透き通った黄色の呈色であるが、グルコース溶液の濃度が高いものは濃い赤橙色の呈色であった。過マンガン酸カリウム水溶液と種々の濃度のグルコース溶液ではグルコース溶液の濃度が低いものはピンク色に呈色し、真ん中あたりの濃度のグルコース溶液については紫色に呈色した。また、高濃度のグルコース溶液である 90mg/L、100mg/L については緑色の呈色であった。過マンガン酸カリウム水溶液と種々の濃度のグルコース溶液について 80mg/L までは検量線を引くことができたことか

ら、単色の濃淡変化や同系色間の変化については本研究手法で検量線を引くことは可能であるが、多色間で呈色に変化する反応を伴う実験については 1 つの検量線を作成することは難しいのではないと考える。しかし、呈色の変化によって場合分けをすることで、それぞれの範囲についての検量線を作成することは可能であるのではないかと考える。

2-2-2 で行った実験では、でんぷん溶液に酵素溶液を加え分解させた。でんぷんは酵素によって分解されるとグルコースに変化するため、でんぷん溶液の酵素反応実験において 2-2-1 の手法と 2-2-3 の手法を併用することで酵素反応によって分解されずに残っているでんぷん量とでんぷんが分解されたことによって生じたグルコース量を算出することができるため、より詳しくでんぷん分解酵素による分解反応について調べることができると思う。

5 セットの 0mg/L から 5mg/L の亜硝酸ナトリウム水溶液を、ザルツマン試薬と反応させ、その呈色から算出したスペクトル変換値の平均値を用いて、作成した亜硝酸ナトリウム水溶液の検量線では 2-2-4 で作成した検量線よりもより正確性の高いものになったのではないかと考える。また、作成した検量線の近似式をもとに算出した亜硝酸ナトリウム濃度についての標準誤差は最大でも 0.13 程度であった。このことから本研究手法は非常に高い正確性で 0mg/L から 5mg/L の範囲の亜硝酸ナトリウム濃度の定量を行うことができると考える。

第 5 節 図表

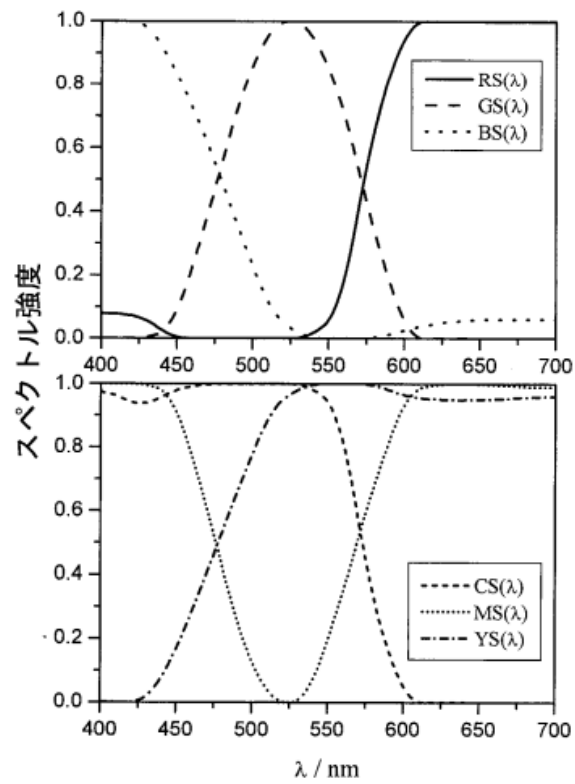


図 2 : スペクトル変換解析に用いた各色の基準スペクトル

デジタル画像から抽出した RGB 値に対してのスペクトル変換解析で判別式に代入する際に用いるそれぞれの波長での各色の基準スペクトル (古賀ら、2004)

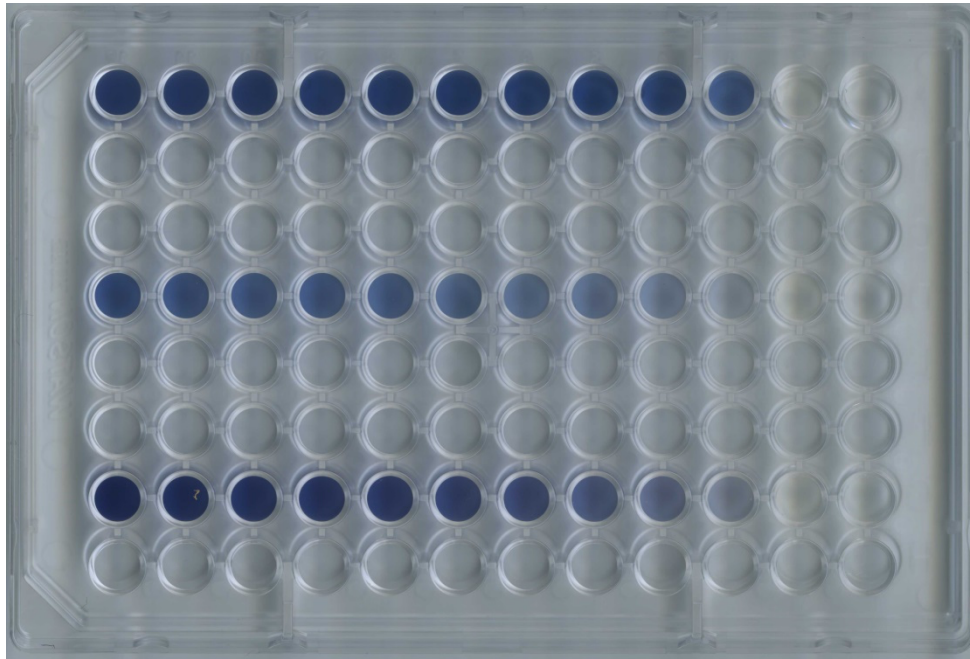


図3：ヨウ素でんぷん反応の標準溶液のデジタル画像

検量線作成のための試料溶液として上からでんぷん濃度 0%から 1.0%まで 0.1%ごとに段階希釈した溶液に、ヨウ素液を $30\ \mu\text{l}$ 加えたものと、0%から 0.1%まで 0.01%ごとに段階希釈した溶液に、ヨウ素液を $20\ \mu\text{l}$ ・ $30\ \mu\text{l}$ 加えたものについて 96 ウェルプレートを用いて作成した。

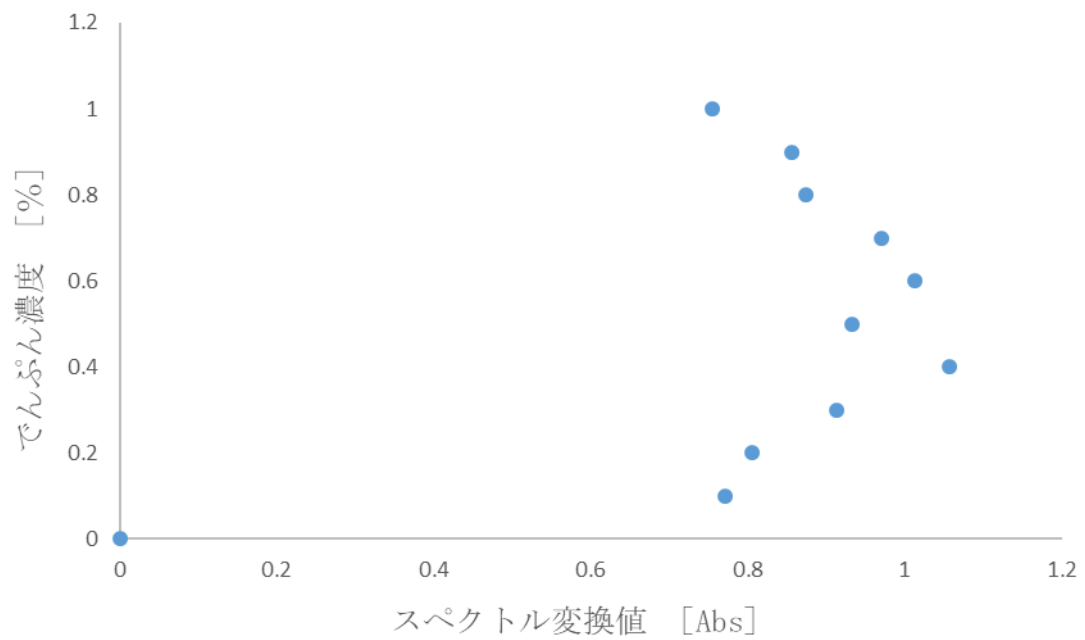


図 4 : 0%から 1.0%の濃度のでんぷん溶液についてのヨウ素でんぷん反応における検量線

図 3 のデジタル画像について `image J` を用いて RGB 値の抽出を行い、それらの値についてスペクトル変換解析を行うことによって、0%から 1.0%の濃度のでんぷん溶液について検量線を作成した。

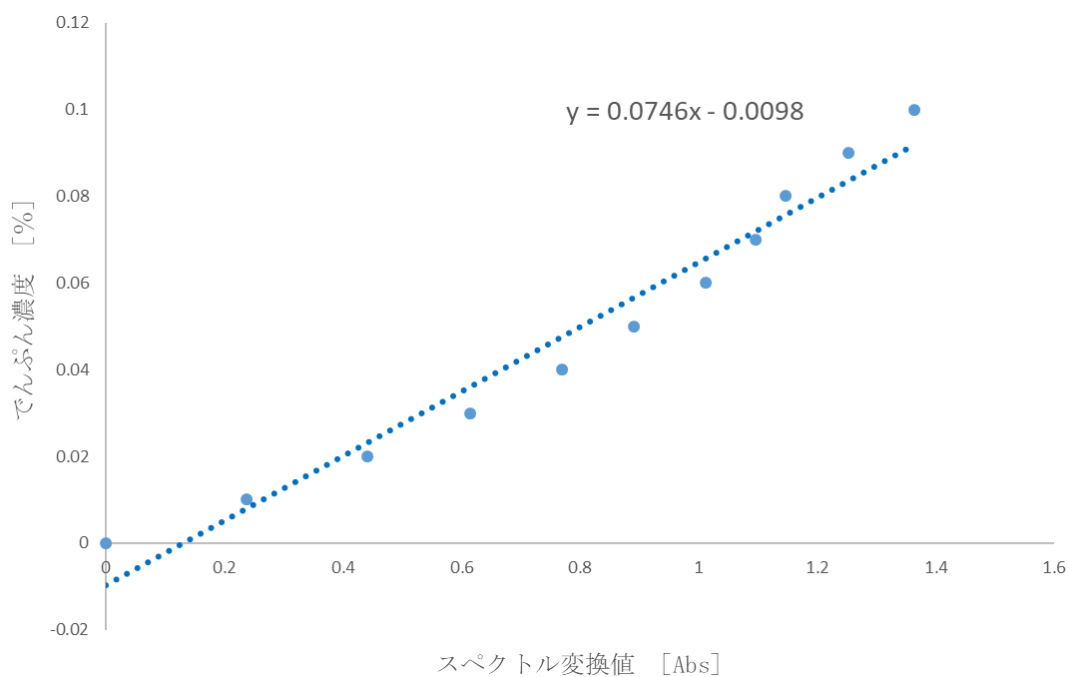


図5：0%から0.1%の濃度のでんぷん溶液についてのヨウ素でんぷん反応における検量線

図3のデジタル画像について image J を用いて RGB 値の抽出を行い、それらの値についてスペクトル変換解析を行うことによって得られた0%から0.1%の濃度のでんぷん溶液について検量線を作成した。

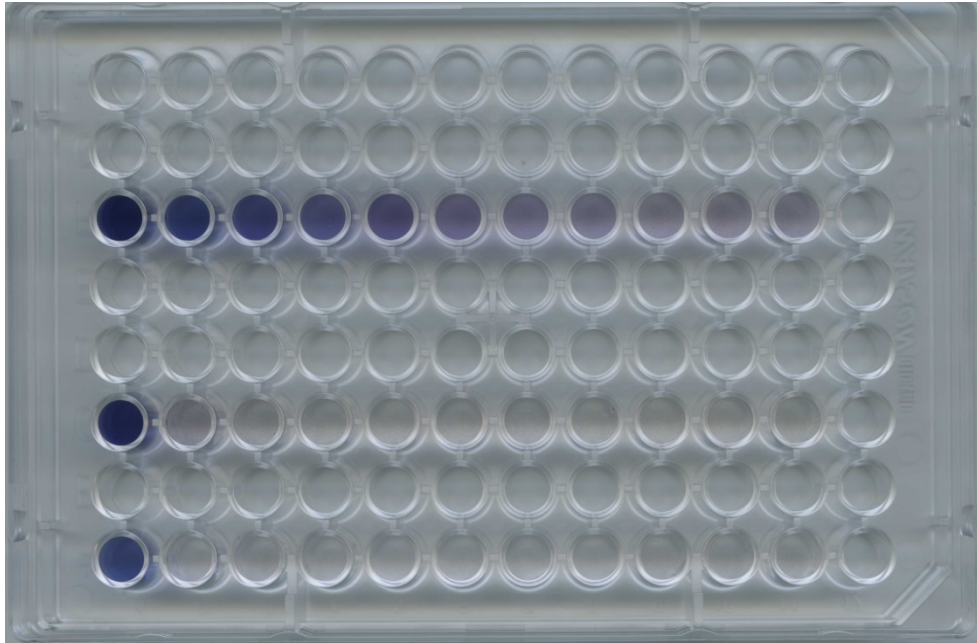


図6：酵素反応溶液についてのデジタル画像

でんぷん分解酵素の分解活性を定量するための試料溶液として、上から0.1%のでんぷん溶液に酵素溶液を $60 \mu\text{l}$ 加え、ヨウ素液を $30 \mu\text{l}$ 加えたもの、0.1%のでんぷん溶液に酵素溶液を $600 \mu\text{l}$ 加え、ヨウ素液を $40 \cdot 30 \mu\text{l}$ 加えたものについて96 ウェルプレートを用いて作成した。

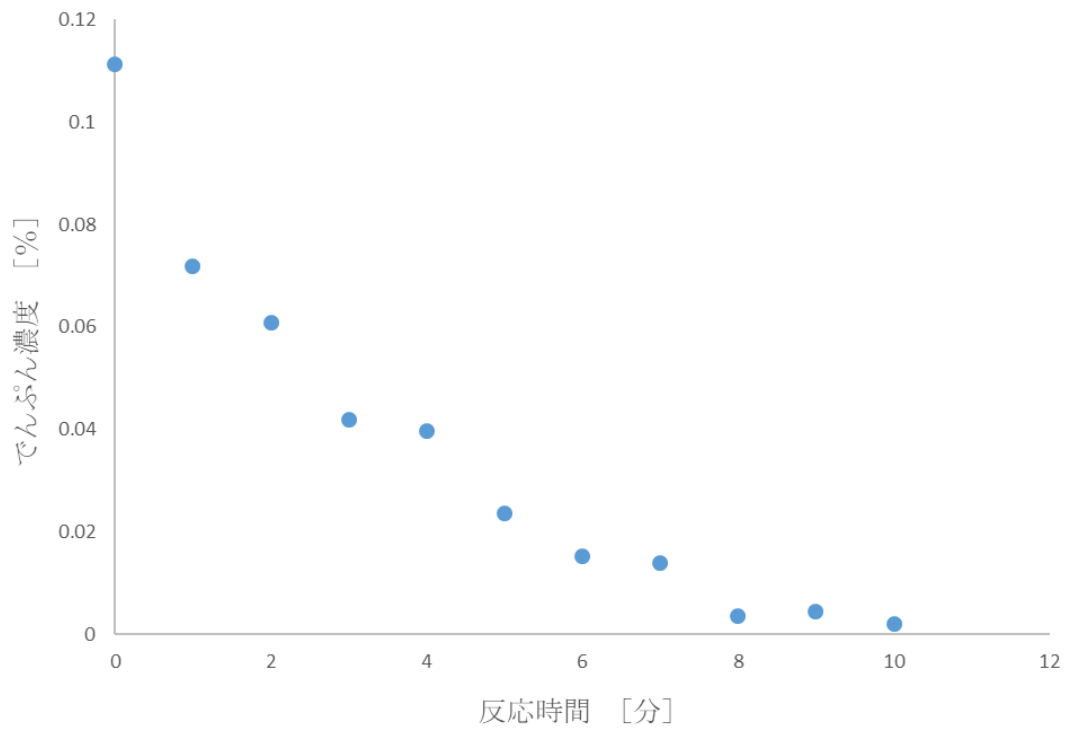


図7：アミラーゼによるでんぷん濃度の継時変化

図6のデジタル画像から image J を用いて、それぞれの反応溶液の RGB 値を抽出し、それらの値についてスペクトル変換解析を行った。算出した値を図3の検量線に代入することで、酵素反応時間ごとのでんぷん濃度を求めた。

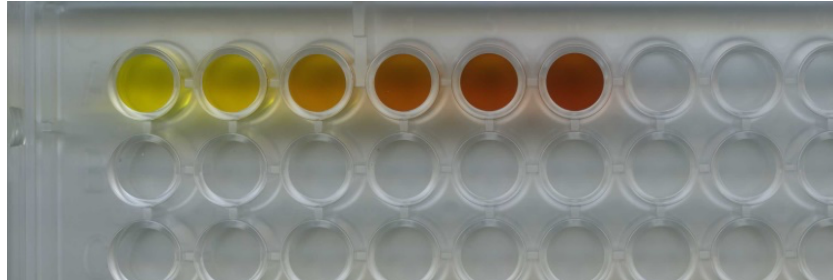


図 8 : 各濃度のグルコース溶液と DNS 試薬の呈色についてのデジタル画像

段階希釈したグルコース溶液に、DNS 試薬を加えて煮沸し、呈色させたものを 96 ウェルプレート各ウェルに移して、デジタル画像を取得した。左からグルコース濃度 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% グルコース溶液の結果を示している。

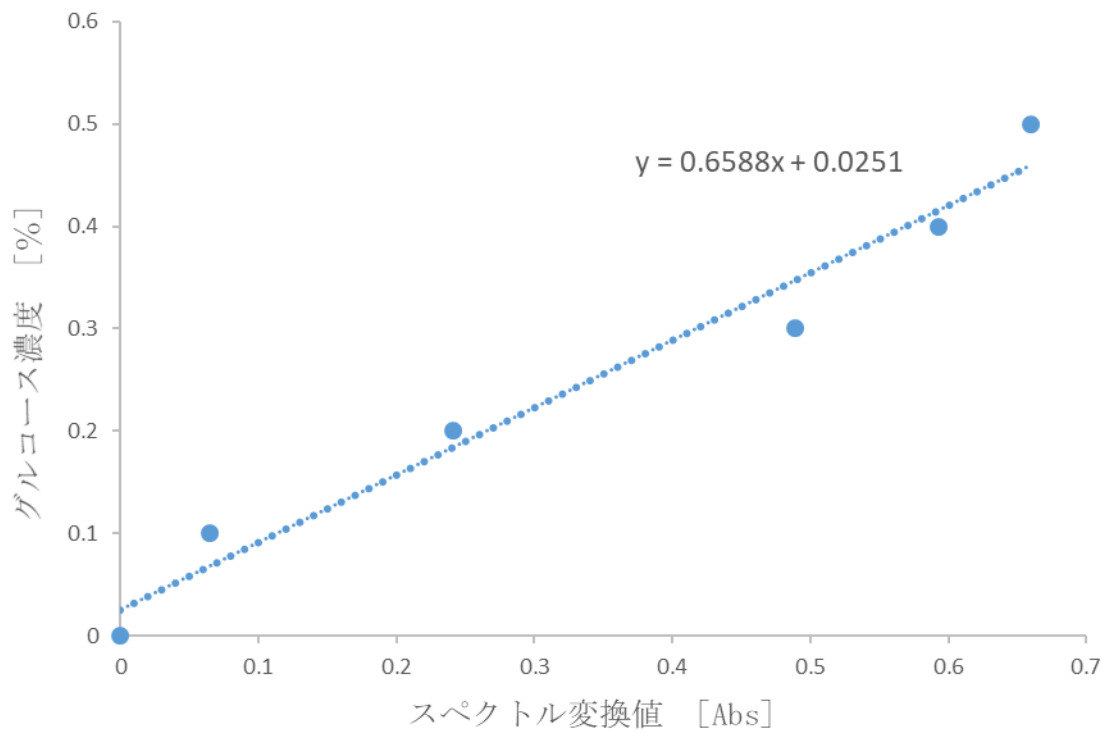


図9：各濃度のグルコース溶液と DNS 試薬の呈色についての検量線

図8のデジタル画像について `image J` を用いて RGB 値の抽出を行い、それらの値についてスペクトル変換解析を行った。

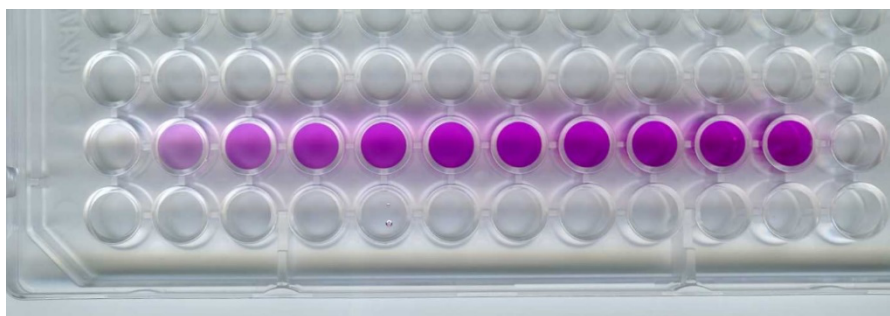


図 10：各濃度の亜硝酸ナトリウム溶液とザルツマン試薬の呈色についてのデジタル画像

検量線作成のための試料溶液として左から亜硝酸ナトリウム濃度 0%から 5.0%まで 0.5%ごとに段階希釈した溶液に、ザルツマン試薬を加えて、呈色させたものものについて 96 ウェルプレートを用いて作成したデジタル画像。

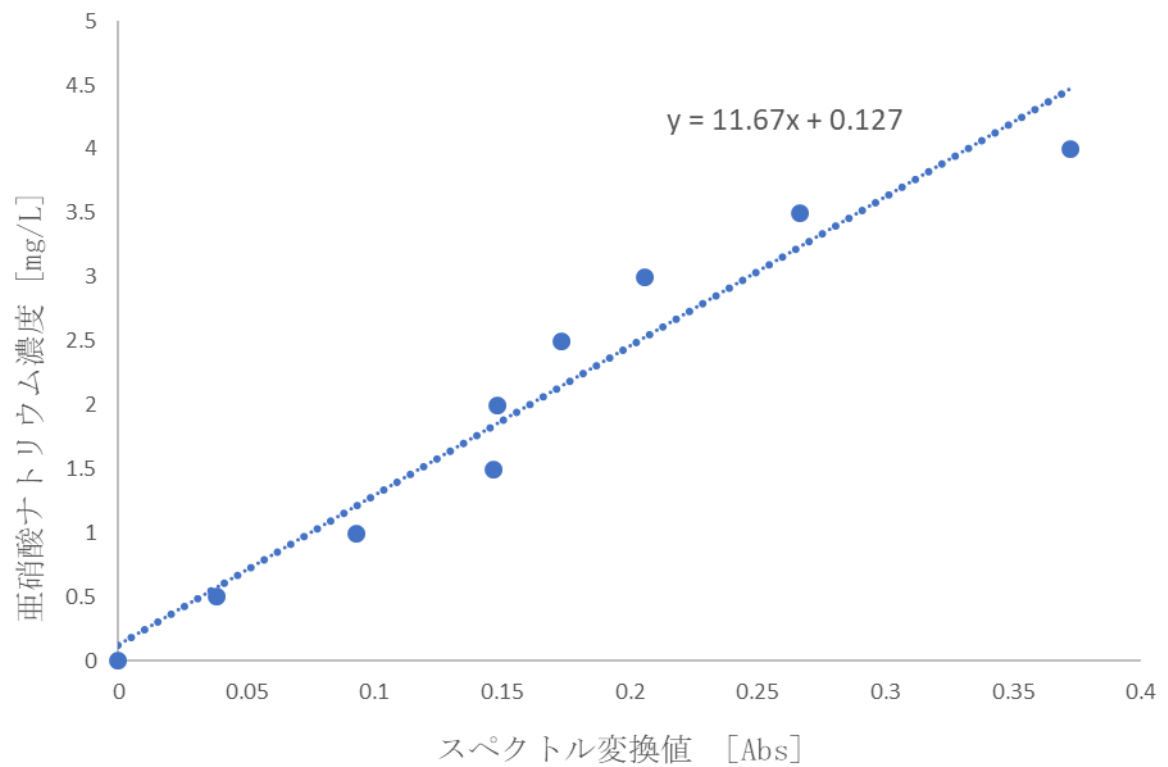


図 11：各濃度の亜硝酸ナトリウム溶液とザルツマン試薬の呈色についての検量線

2-2-4 で作成したデジタル画像（図 10）について image J を用いて RGB 値の抽出を行い、それらの値についてスペクトル変換解析を行うことによって得られた 0% から 5.0% の濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液についての検量線。

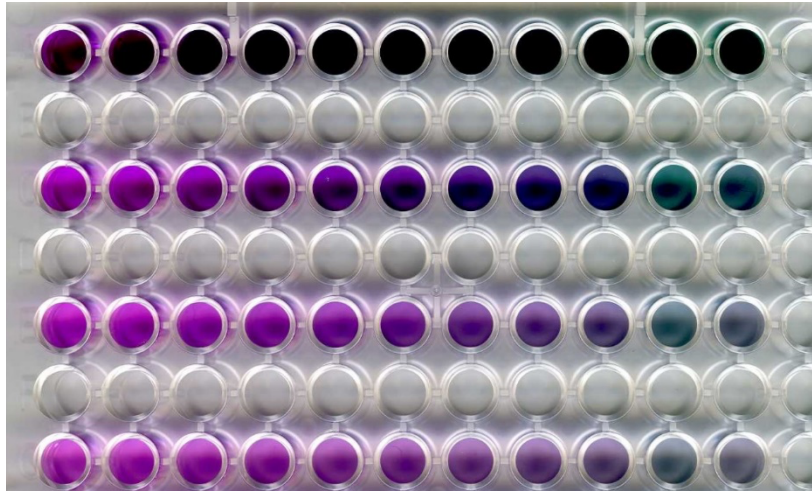


図 12 : 各濃度のグルコース溶液と過マンガン酸カリウム水溶液の呈色についてのデジタル画像

0mg/L から 100mg/L まで 10mg/L ごとに段階希釈したグルコース溶液に、過マンガン酸カリウム水溶液を加えて反応させ、呈色させた。その溶液について、上から全量を 25ml、50ml、75ml、100ml となるように希釈したものについて 96 ウェルプレートを用いて作成したデジタル画像。

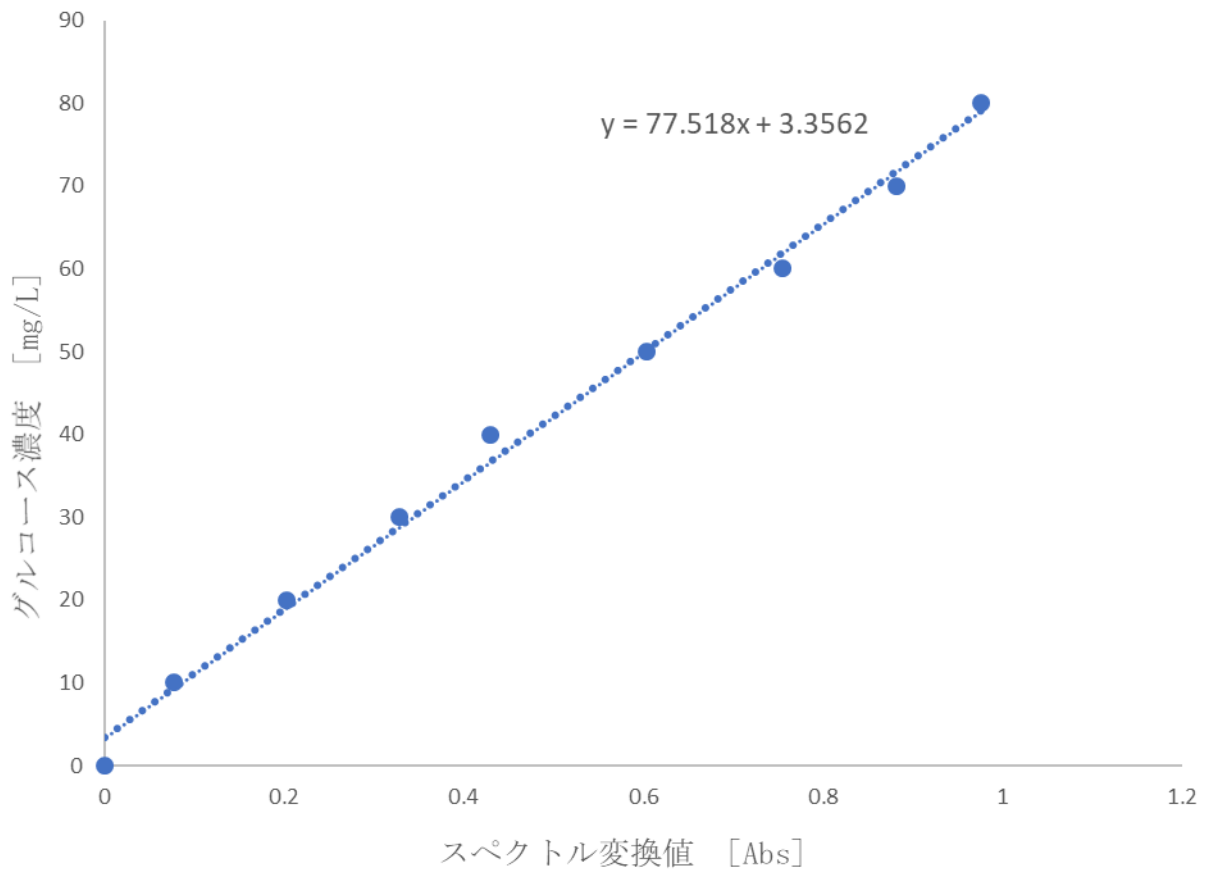


図 13：各濃度のグルコース溶液と過マンガン酸カリウム水溶液の呈色についての検量線

図 12 の全量が 75ml になるよう希釈した溶液について、デジタル画像から image J を用いて RGB 値の抽出を行い、それらの値についてスペクトル変換解析を行った。得られたスペクトル変換値を用いて、検量線を作成した。

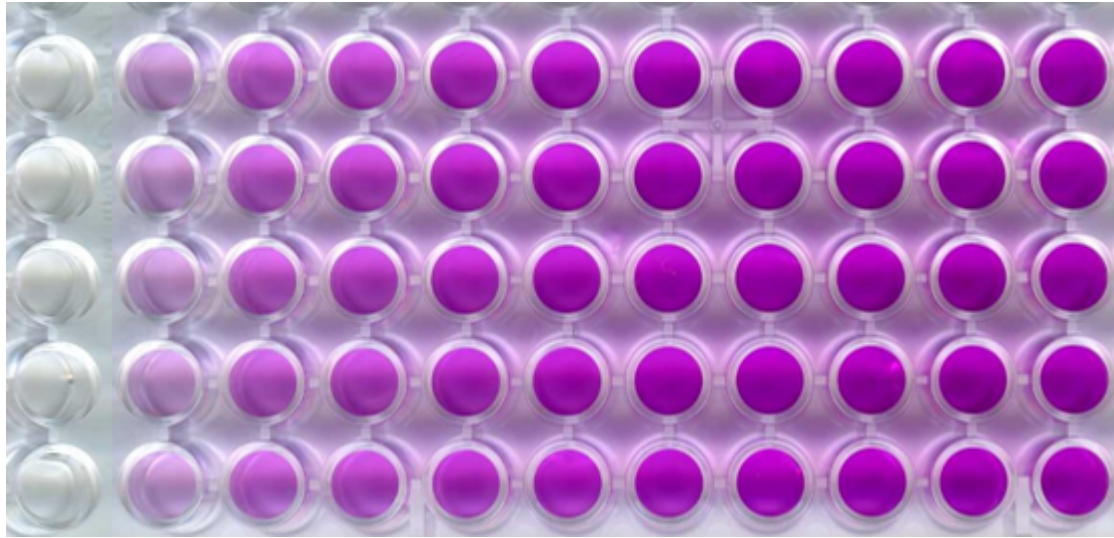


図 14 : 5 セットの各濃度の亜硝酸ナトリウム溶液とザルツマン試薬の呈色についてのデジタル画像

検量線作成のための試料溶液として左からそれぞれ亜硝酸ナトリウム濃度 0%から 5.0%まで 0.5%ごとに段階希釈した溶液に、ザルツマン試薬を加えて、呈色させたものもの 5 セットについて 96 ウェルプレートを用いて作成したデジタル画像。

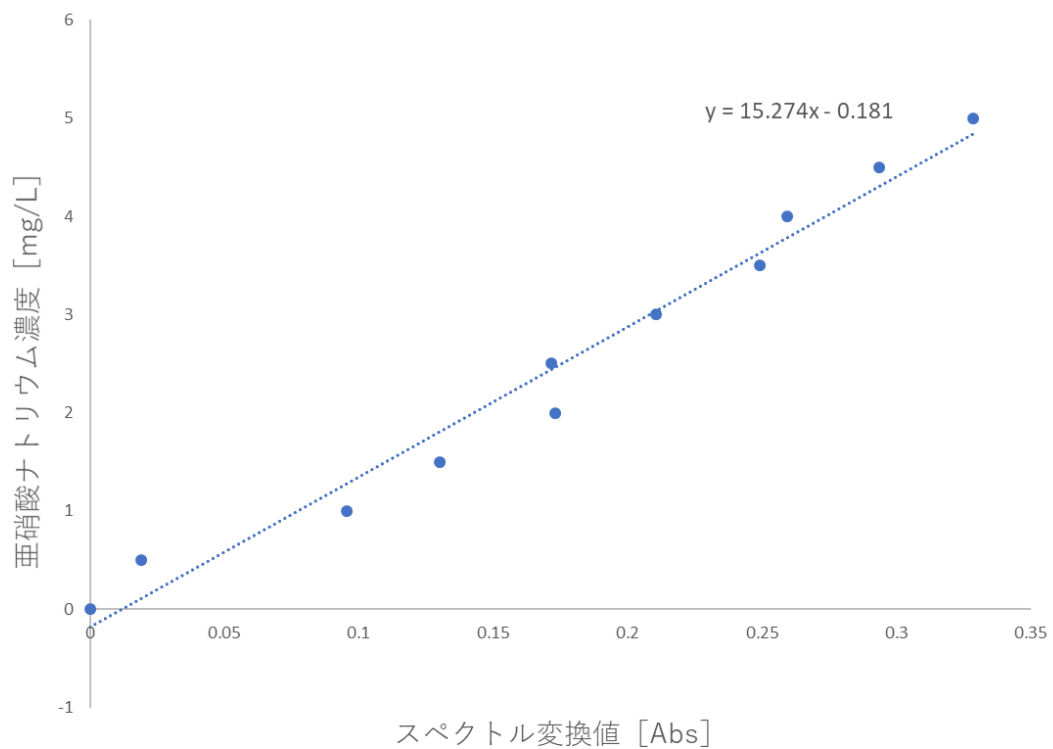


図 15 : 5 セットの 0mg/L から 5mg/L の亜硝酸ナトリウム水溶液のスペクトル変換値の平均値を用いて作成した検量線

2-2-6 で作成したデジタル画像（図 14）について `image J` を用いて RGB 値の抽出を行い、それらの値についてスペクトル変換解析を行うことによって得られた 5 セットの 0% から 5.0% の濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液のスペクトル変換値の平均値を用いて作成した検量線。

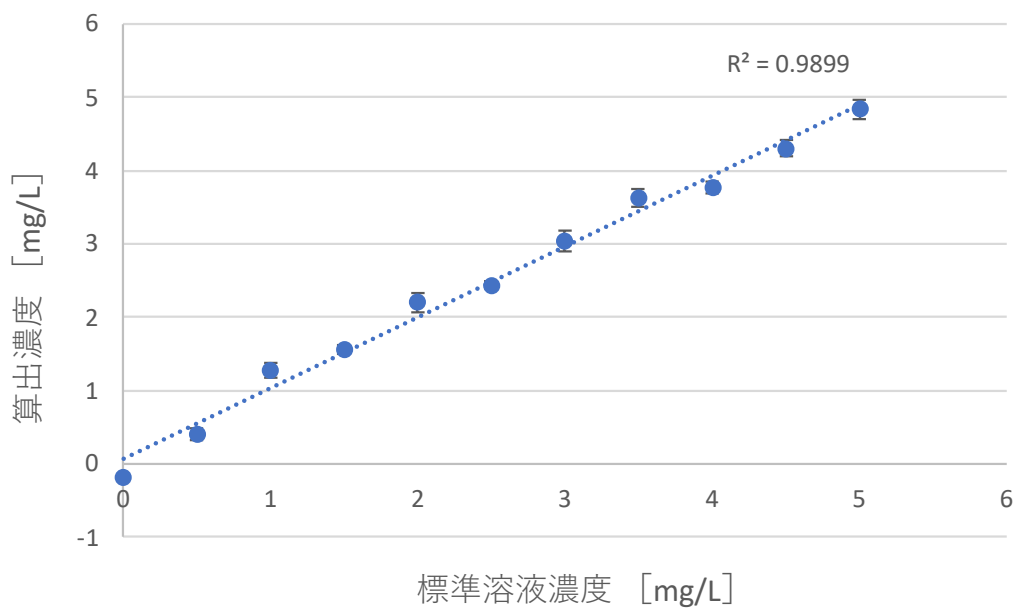


図 16 : 算出したそれぞれの亜硝酸ナトリウム濃度と標準誤差

2-2-6 で作成した検量線（図 15）の近似式にそれぞれ求めたスペクトル変換値を代入することによって算出した亜硝酸ナトリウム濃度とその濃度算出における標準誤差をエラーバーで示している。

第3章 本研究手法とパックテストの正確さの比較

第1節 目的

分光光度計のような高価な測定機械を使用しないで簡易に化合物濃度を定量する方法として、共立理科学研究所のパックテストが挙げられる。パックテストは、チューブ内に試料溶液を入れ、設定された反応時間になった際の呈色を標準色のプレートと比較することによって、溶液中の化合物濃度を算出するという非常に簡易な定量方法である。本章では、化合物濃度測定の正確さや測定可能範囲について、本研究手法とパックテストを比較検証することを目的とした。

第2節 材料と方法

3-2-1 亜硝酸濃度測定のパックテストの測定の正確性の検証

1. 0mg/L 亜硝酸ナトリウム水溶液(林純薬工業株式会社)を 0mg/L から 1. 0mg/L まで 0. 1mg/L ごとに段階希釈し、試料溶液とした。作成したそれぞれの濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液について、パックテストで算出される濃度と実際に調整した亜硝酸ナトリウム水溶液の濃度を比較した。同様に、低濃度部分をより細かく検証するために、0mg/L から 0. 1mg/L まで 0. 02mg/L ごとに段階希釈した亜硝酸ナトリウム水溶液を作成し、それぞれ水溶液についてパックテストで算出される濃度と実際に調整した亜硝酸ナトリウム水溶液の濃度を比較した。パックテストで亜硝酸濃度を算出する際には、共立理科学研究所が配信しているスマートフォン用のアプリ (スマートパックテスト) も用いた。

3-2-2 COD 測定のパックテストの測定の正確性の検証

100 mg/L グルコース溶液 (ナカライテスク株式会社) を、0mg/L から 100mg/L まで 10mg/L ごとに段階希釈した。それぞれのグルコース溶液について、パックテストで算出される濃度と実際の濃度を比較した。同様に、低濃度での検証をするために、0, 2, 4, 6, 8, 10mg/L のグルコース溶液を調製し、それぞれのグルコース溶液についてパックテストで算出される濃度と実際の濃度を比較した。

3-2-3 亜硝酸濃度測定のパックテストと本研究手法の正確性の比較

1. 0mg/L 亜硝酸ナトリウム水溶液(林純薬工業株式会社)を 0mg/L から 1. 0mg/L まで 0. 25mg/L ごとに段階希釈し、試料溶液とした。作成したそれぞれの濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液について、パックテストを行い、そのパックテストにつ

いて、スマートパックテストを用いて濃度算出を行った。同様の操作を、各濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液について5回ずつ行い、亜硝酸濃度算出の正確性と精度を求めた。同様に、1.0mg/L 亜硝酸ナトリウム水溶液(林純薬工業株式会社)を0mg/Lから1.0mg/Lまで0.25mg/Lごとに段階希釈し、試料溶液について、本研究手法を用いて、2-2-1と同様にスペクトル変換解析を行った。算出したRGBスペクトル変換値について対数変換を行うことによって、ザルツマン試薬と亜硝酸ナトリウムの呈色による検量線の作成、溶液の亜硝酸濃度算出を行った。この実験結果をもとにパックテストと本研究手法の0mg/Lから1.0mg/Lまでの亜硝酸濃度算出における正確さと精度の比較をした。

第3節 結果

3-3-1 亜硝酸濃度測定のパックテストの測定の正確性の検証

パックテストを用いて、標準色と比較することで、0mg/L、0.1mg/L、0.5mg/L 亜硝酸ナトリウムを定量することができた（図 17）。しかしながら、0.1mg/L から 0.5mg/L の間の濃度の溶液を呈色の変化によって定量することは困難であった。また、0.5mg/L 以上の濃度の溶液については濃度変化に伴う呈色の濃淡の変化が目視では確認できなかつたため、亜硝酸濃度を定量することは難しかった。それに加えて、より低い濃度の亜硝酸についてのパックテストにおいても、呈色の変化によって、溶液の亜硝酸濃度を定量することは難しかった（図 18）。スマートフォンアプリ スマートパックテストを用いることで、0mg/L から 0.5mg/L までの溶液についての亜硝酸濃度を呈色させたパックテストの写真を撮影することによって、ある程度の正確さで算出することはできた。しかしながら、0.5mg/L 以上の濃度の亜硝酸溶液について実験を行ったところ、0.6 mg/L に調整した溶液について行ったパックテストを前述した操作と同様の手順でスマートパックテストを用いて定量すると結果は 0.79mg/L となり、実際の濃度よりもかなり大きな値を示した。同様に 1.0mg/L の溶液について定量を行ったところ、0.69mg/L という結果になり、実際の濃度よりも低い値を示した。このことから、0.5mg/L 以上の濃度の亜硝酸溶液についてのパックテスト及びスマートパックテストを用いた定量では正確な濃度を算出することはできないということがわかった。

3-3-2 COD 測定のパックテストの測定の正確性の検証

パックテスト COD での反応液は、多様な呈色を示した。標準色と見比べることによって、0mg/L、10mg/L、20mg/L の濃度のグルコース溶液について呈色によ

ってある程度正確に濃度算出を行うことができるとわかった。同様に、0mg/L、10mg/L、20mg/L の濃度のグルコース溶液についてスマートパックテストを用いて行った濃度算出でも、それぞれ 0mg/L、10.5mg/L、20.8mg/L とかなりの正確性を示すことがわかった。これらのことから、0mg/L、10mg/L、20mg/L の濃度のグルコース溶液については標準色とパックテストの呈色を目視で比較する方法とスマートパックテストを用いる方法のどちらにおいてもかなりの正確さでグルコース濃度を算出することができることがわかった。しかしながら、20mg/L から 50mg/L の間の濃度や 50mg/L 以上の濃度について算出することは難しかった (図 19)。

3-3-3 亜硝酸濃度測定のパックテストと本研究手法の正確性の比較

パックテストによる濃度算出は 0mg/L から 0.5mg/L までの濃度の亜硝酸溶液については正確性・精度ともに高いことがわかった。しかし、0.5mg/L 以上の濃度の亜硝酸溶液についての濃度算出では、実際の濃度よりも低い値を示し、亜硝酸濃度を過小評価する傾向があることがわかった。算出濃度について、精度は高いものの、正確性が低いため、実験に対して有用ではないことがわかった。一方、本研究手法を用いた 0mg/L から 1.0mg/L までの濃度の亜硝酸溶液についての濃度算出では、正確性・精度ともにかなり高いということがわかった (図 20)。

第4節 考察

亜硝酸濃度測定については0mg/L、0.1mg/L、0.5mg/Lといったパックテストの標準色となっている濃度の亜硝酸溶液、COD測定については0mg/L、10mg/L、20mg/Lの濃度のグルコース溶液において、パックテスト及びスマートパックテストを用いてある程度高い正確性で濃度算出することができるのではないかと考える。一方、それ以上の濃度についてはパックテストによる濃度算出は難しかった。COD測定では、0mg/L、10mg/L、20mg/Lの濃度のグルコース溶液についてある程度の正確に濃度算出を行うことができた。これは、標準色からもわかるように示した濃度において呈色が大きく変化するので、それにより色の変化から濃度算出が容易に行うことができた。(図19)一方、20mg/Lから50mg/Lの溶液については濃度変化に伴うパックテストの呈色の変化がわずかである。また、50mg/L以上の濃度の溶液については、濃度が変わってもパックテストの呈色が変わることは目視では確認することができなかった。これらのことより、目視である程度、濃度変化に伴うパックテストの呈色の変化を確認することができる部分において、標準色との比較やスマートパックテストを用いてある程度正確に濃度算出を行うことができると考える。これらの結果から、パックテストは非常に簡易な化合物濃度を定量することのできる方法であるが、その測定範囲は狭く、応用することのできる実験も限られてしまうと考えられる。実際に行われた例を取り上げると、地下水水質調査の結果から地下水中の亜硝酸濃度は約5mg/L～12mg/Lほどであるとわかった。(宮城俊彦、2013年)また、同様に農村部で行われた地下水水質調査の結果から地下水中の亜硝酸濃度は0mg/L～約10mg/Lであり、一部の地域の地下水には約30mg/Lの亜硝酸が含まれていることがわかった。(梅田ら、2004年)さらに、環境省が定める一般排水基準では亜硝酸

化合物及び硝酸化合物の許容限度は 100mg/L とされていることから、100mg/L までの濃度の亜硝酸については環境水中に存在しうるということである。それに対して、亜硝酸についてのパックテストの測定範囲は 3-3-1 でも述べたように最大値で 0.5mg/L 程度であり、環境水中の亜硝酸濃度を定量することに対しては測定範囲が限定的すぎると考える。同様に、COD 測定については、工業排水や工業用水、生活用水などに対して行なわれた調査の結果から排水中に含まれるグルコース濃度は 0mg/L～約 50mg/L であることがわかった。また、工業排水でも元の工場の種類によってその COD 値は大きく変化し、染色工場の排水ではグルコース濃度が約 130mg/L～500mg/L であることが結果としてわかった。(大森正男、1979 年) さらに、環境省の一般排水基準では COD は 160mg/L(日間平均 120mg/L)とされており、亜硝酸濃度測定について述べたことと同様に、3-3-2 でわかった COD に対してのパックテストの想定範囲の最大値は 20mg/L 程度であり、環境水などについての測定を行う課題研究においては測定範囲がかなり狭いのではないかと考える。一方、本研究で示した方法(図 1)では、0mg/L から 5.0mg/L の亜硝酸濃度、0mg/L から 80mg/L の COD の測定が可能である。よって、どちらについても本研究手法の方がパックテストよりも大幅に広い測定範囲を持つことになる。また、測定の正確さについても本研究手法が測定誤差は少なく、1 試料あたりの測定価格はパックテストでは約 100 円かかるのに対し、本研究手法は約 2 円と 50 分の 1 で測定可能である。このような点から、高等学校における探究学習においてより有用であるのではないかと考える。しかしながら、パックテストは数分間反応時間待つだけでよいのに対して、本研究手法は試料溶液と試薬の混合、デジタル画像の取得、Image J による RGB 値の抽出など多くの作業が必要であり、パックテストに比べて測定に時間がかかるという課題もある。(図 20)。本研究手法は環境水中や大気中、食品中などの亜硝酸濃度・COD の

測定などを目的とした課題研究などに有効的に用いることが出来るのではないかと考える。

第5節 図表

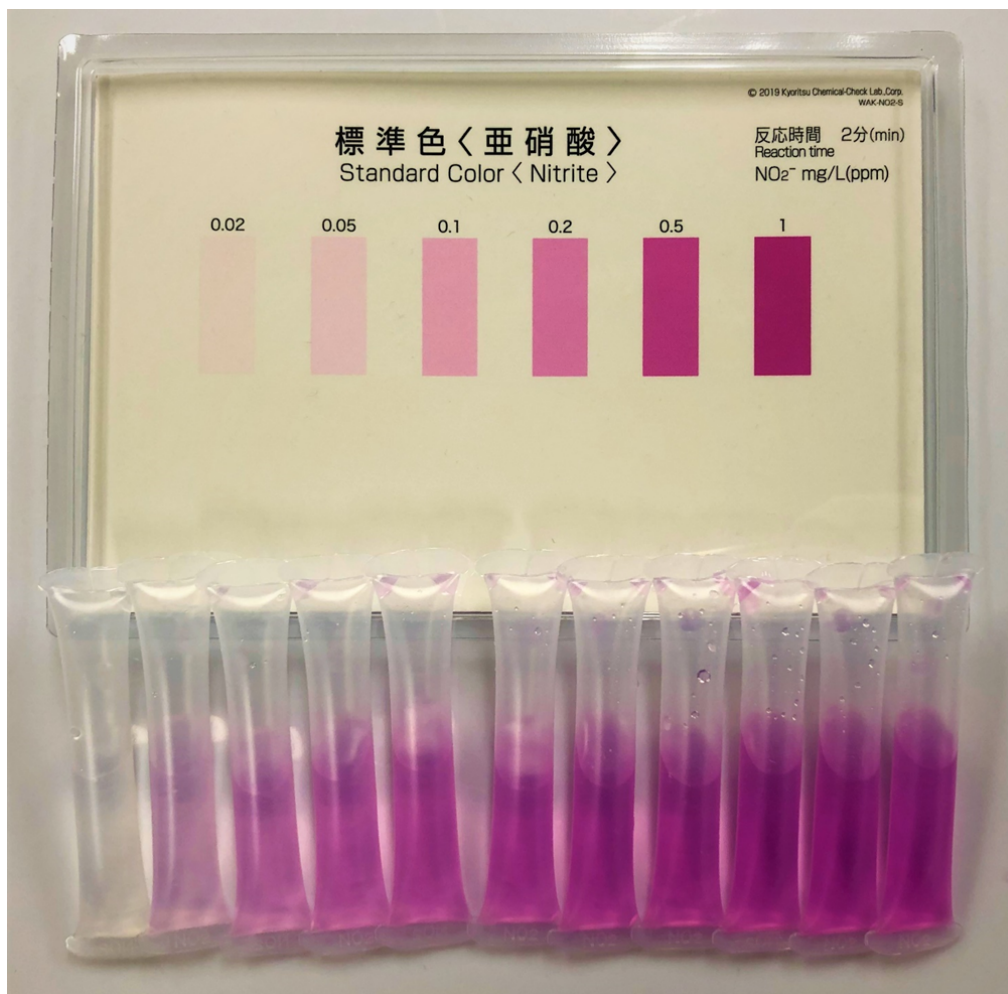


図 17 : 0mg/L から 1mg/L の濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液についてのパックテスト

3-2-1 で 0mg/L から 1.0mg/L まで 0.1mg/L ごとに段階希釈し、各濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液を作成した。作成したそれぞれの濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液についてパックテストを行い作成した亜硝酸パックテストの標準色との比較画像

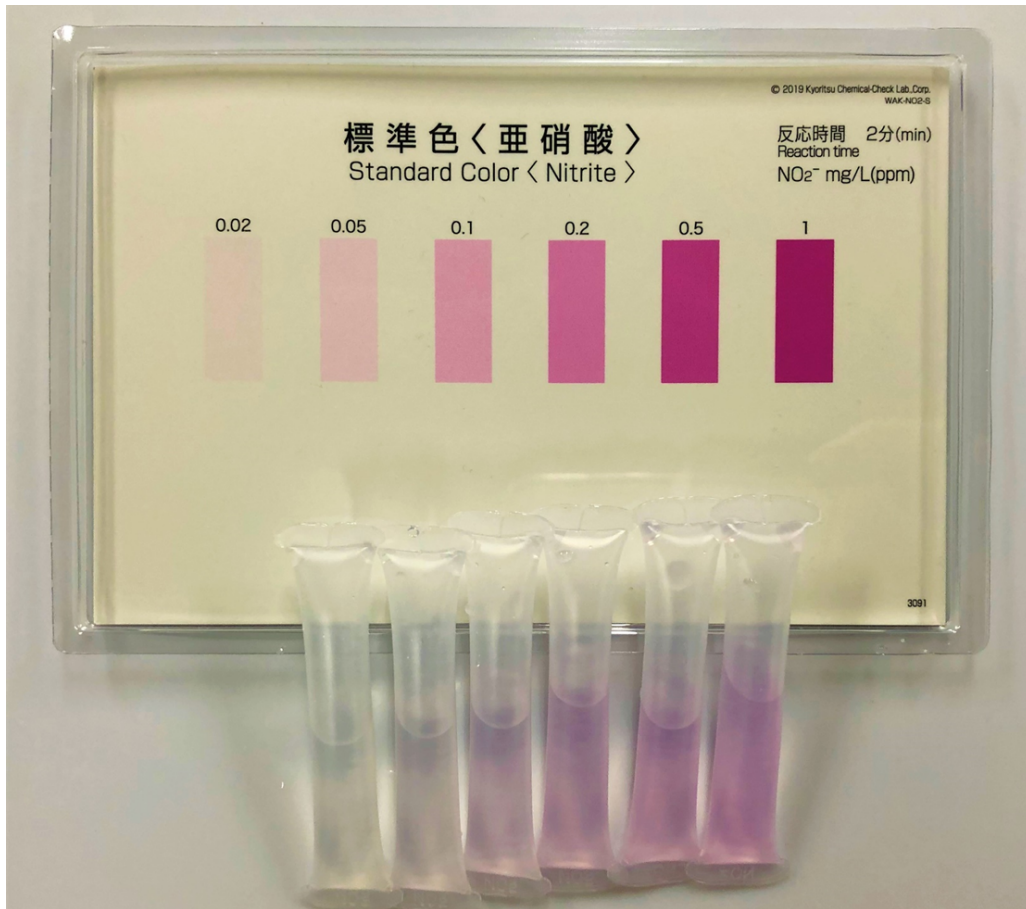


図 18 : 0mg/L から 0.1mg/L の濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液についてのパックテスト

3-2-1 で 0mg/L から 0.1mg/L まで 0.02mg/L ごとに段階希釈し、各濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液を作成した。作成したそれぞれの濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液についてパックテストを行い作成した亜硝酸パックテストの標準色との比較画像



図 19 : 0mg/L から 100mg/L の濃度のグルコース溶液についてのパックテスト
3-2-2 で 0mg/L から 100mg/L まで 10mg/L ごとに段階希釈し、各濃度のグルコース溶液を作成した。作成したそれぞれの濃度のグルコース溶液についてパックテストを行い作成した COD パックテストの標準色との比較画像

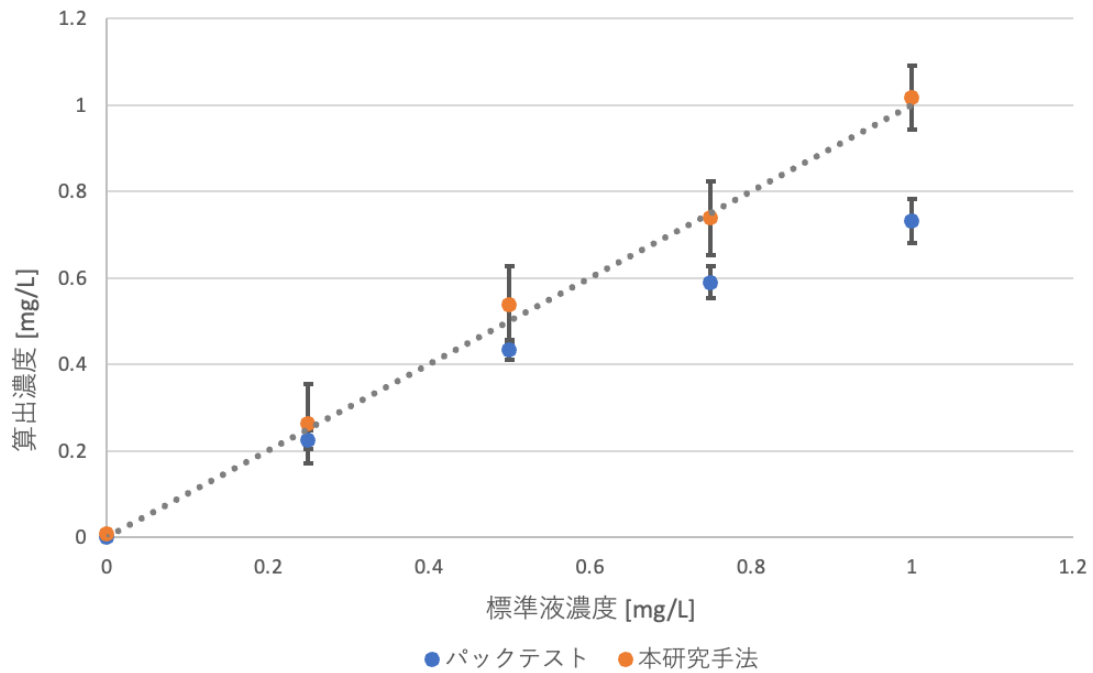
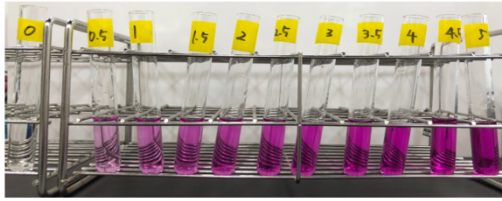


図 20 : 0mg/L から 1.0mg/L の亜硝酸濃度算出における本研究手法とパックテストの正確さと精度の比較

3-2-3 で 0mg/L から 1.0mg/L まで 0.25mg/L ごとに段階希釈し、各濃度の亜硝酸ナトリウム溶液を作成した。作成したそれぞれの濃度の亜硝酸ナトリウム溶液についてパックテストと本研究手法による濃度算出を各濃度 5 回ずつ行い、亜硝酸濃度算出における正確性と精度について比較した。



0mg/L ~ 5.0mg/L	範囲	0mg/L ~ 0.5mg/L
30分	時間	10分
◎	正確さ	○
約2円	価格	約100円

図 21：亜硝酸濃度測定における本研究手法とパックテストとの比較

亜硝酸ナトリウム濃度の定量において本研究手法とパックテストの測定範囲と所要時間、測定の正確さ、1試料あたりの測定価格の比較画像

参考文献

1. 文部科学省, 2018, 高等学校学習指導要領 総合的な探究の時間 編
2. 文部科学省, 2018, 高等学校学習指導要領 理科編 理数編
3. 古賀信吉, 宇都岡貴秀, 化学と教育 2004, 52(11), 771-774. 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
4. 阿部倫則, 佐々木次郎, 金澤健二, 駒田充生, 高橋茂, 日本土壤肥料学雑誌 2018, 89(4), 317-320. デジタル画像解析による COD 簡易比色キット測定値の定量とそれを用いた絶乾土水振とう抽出法による水田土壌可給態窒素含量の推定
5. 大森正男, 環境技術 1979, 8(6), 589-602. COD 測定に関する二, 三の考察 - 水質総量規制の実施にあたって-
6. 宮城俊彦, 水環境学会誌 2013, 36(4), 129-135 平成元年度から 22 年度までの沖縄県における地下水水質調査
7. 梅田直人, 村上哲, 安原一哉, 小峯秀雄, 地盤工学研究発表会, 2004, 発表講演集, pp. 1165-166. 農村部における硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素濃度に関する地下水水質調査の動態計測
8. 杉本良一, 紺野昇, 鳥海重治, 鳥取大学教育学部研究報告, 1995-08, 教育科学, pp. 1-20. パソコンを用いた比色計による環境調査の教材化-1-中学校の選択理科における環境教育の実践
9. 杉本良一, 紺野昇, 鳥取大学教育学部研究報告, 1996-08, 教育科学, pp. 117-137. パソコンを用いた比色計による環境調査の教材化-2-小学校における酸性雨測定の授業実践
10. 杉本良一, 紺野昇, 井上晴貴, 鳥取大学教育学部研究報告, 1997-07, 教育科

学, pp. 55-74. パソコンを用いた比色計による環境調査の教材化-3-河川水の COD 測定

11. 日本製紙連合会環境保全委員会, 水質総量規制検討小委員会, 紙パ技協誌, 1982, 36(3), 347-356 紙パルプ排水の水質自動計測器による COD 測定の実地テスト結果

12. 環境省 一般排水基準

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切かつ丁寧にご指導賜りました三重大学教育学部理科教育コース化学研究室の市川先生に深く感謝申し上げます。また、実験を遂行するにあたり、ご指導、助言をいただきました教育学部理科教育コース化学研究室の皆様にも心より御礼申し上げます。