

キトサンおよびその誘導体の分析化学への応用

倉内, 芳秋

<https://doi.org/10.11501/3150975>

出版情報 : 九州大学, 1998, 博士 (工学), 論文博士
バージョン :
権利関係 :

キトサンおよびその誘導体の分析化学への応用

倉内芳秋

キトサンおよびその誘導体の分析化学への応用

平成10年11月

倉内 芳秋

目 次

第1章 序論	・・・1
1.1 研究の背景と目的	・・・1
1.2 本論文の概要	・・・3
参考文献	・・・4
第2章 金属イオンセンサプローブとしての利用	・・・6
2.1 <i>N</i> -(2-ヒドロキシベンジル)キトサン修飾電極による銅および鉛イオンの微量分析	・・・8
2.1.1 試薬および装置	・・・8
2.1.2 <i>N</i> -(2-ヒドロキシベンジル)キトサンの合成	・・・8
2.1.3 修飾電極の作製	・・・9
2.1.4 サイクリックボルタンメトリー	・・・10
2.1.5 結果と考察	・・・11
2.1.5.1 <i>N</i> -(2-ヒドロキシベンジル)キトサンの合成	・・・11
2.1.5.2 修飾電極の作製	・・・11
2.1.5.3 金属イオンの測定	・・・14
2.2 ピリドキサル類似体で修飾したキトサンを感応部とする光ファイバ蛍光センサを用いた亜鉛イオンの定量	・・・19
2.2.1 試薬および装置	・・・19
2.2.2 5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジンによるキトサンの修飾	・・・20
2.2.2.1 5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジンの合成	・・・22
2.2.2.2 キトサンのプロモアセチル誘導体の合成	・・・24
2.2.2.3 5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジンでの修飾	・・・25
2.2.3 プローブの作製と蛍光測定	・・・25
2.2.4 結果と考察	・・・26
2.2.4.1 5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジンの同定	・・・26

2.2.4.2	5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル- 2-メチルピリジンによるキトサンの修飾	・・・ 30
2.2.4.3	5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル- 2-メチルピリジン修飾キトサンの紫外可視および 蛍光スペクトル	・・・ 33
2.2.4.4	センサの応答特性	・・・ 36
2.3	総括	・・・ 40
	参考文献	・・・ 41

第3章	ピレン誘導体で修飾したキトサンを感応部とする有機溶媒中 微量水分測定用光ファイバ蛍光センサ	・・・ 43
3.1	実験	・・・ 44
3.1.1	試薬および装置	・・・ 44
3.1.2	1-カルボキシプロピルフォルミルピレンの合成	・・・ 45
3.1.3	1-カルボキシプロピルフォルミルピレン修飾キトサン膜の調製	・・・ 47
3.1.4	光ファイバへのキトサン膜の被覆と1-カルボキシプロピル フォルミルピレンによる修飾	・・・ 47
3.2	結果と考察	・・・ 49
3.2.1	1-カルボキシプロピルフォルミルピレンの同定	・・・ 49
3.2.2	1-カルボキシプロピルフォルミルピレンによる修飾 キトサン膜の分析	・・・ 54
3.2.3	有機溶媒中の水含量測定	・・・ 57
3.3	総括	・・・ 57
	参考文献	・・・ 60

第4章	キトサン複合膜をクラッドとする内部全反射型光ファイバセンサの 水中有機溶媒に対する応答および酒類中エタノール定量への応用	・・・ 61
4.1	応答機構	・・・ 62
4.2	実験	・・・ 63
4.2.1	試薬	・・・ 64
4.2.2	センサ応答部位の作製	・・・ 64

4.2.3	装置組立と測定手順	・・・65
4.2.4	電子顕微鏡による表面観測	・・・68
4.3	水中有機溶媒への応答	・・・68
4.3.1	応答特性	・・・70
4.3.2	応答量と屈折率および収縮率	・・・70
4.3.3	応答機構の実証	・・・73
4.3.4	テフロンコーティングと応答速度	・・・75
4.3.5	塩素化炭化水素への応答	・・・75
4.4	酒類中エタノール定量への応用	・・・77
4.4.1	応答曲線と耐久性および再現性	・・・77
4.4.2	グルタルアルデヒド架橋の効果	・・・77
4.4.3	酒類への適用	・・・84
4.5	総括	・・・87
	参考文献	・・・87
第5章 色素修飾キトサン複合膜をクラッドとする内部全反射型		
	光ファイバセンサの有機酸に対する応答特性	・・・89
5.1	実験	・・・90
5.1.1	試薬	・・・90
5.1.2	センサ作製と装置組立および測定手順	・・・91
5.1.3	色素の吸収スペクトルおよび膜への吸着	・・・92
5.2	結果および考察	・・・93
5.2.1	グルタルアルデヒド架橋の影響および有機酸応答選択性	・・・93
5.2.2	色素の紫外可視吸収スペクトル	・・・96
5.2.3	検出波長特性	・・・100
5.2.4	色素の構造と応答の関係	・・・101
5.2.5	膜への色素吸着量	・・・103
5.2.6	色素吸着膜の膨潤率および屈折率	・・・105
5.2.7	テフロン保護膜と応答速度	・・・105
5.2.8	有機酸の構造と応答	・・・107
5.2.9	テフロンコーティングおよび食酢中の有機酸含量の定量	・・・113

5.3 総括	・・・115
参考文献	・・・116
第6章 β -シクロデキストリンで修飾したキトサンの分子認識	・・・117
6.1 実験	・・・119
6.1.1 試薬および装置	・・・119
6.1.2 <i>N</i> -(カルボキシメチル)キトサンの合成	・・・121
6.1.3 モノ(6-アミノ-6-デオキシ)- β -シクロデキストリンの合成	・123
6.1.3.1 β -シクロデキストリンのモノトシル化	・・・123
6.1.3.2 モノ(6-O- <i>p</i> -トリルスルホニル)- β -シクロデキストリン のアジド化	・・・124
6.1.3.3 モノ(6-アジド-6-デオキシ)- β -シクロデキストリン の還元	・・・124
6.1.3.4 モノ(6-アミノ-6-デオキシ)- β -シクロデキストリン の精製	・・・125
6.1.3.5 総括	・・・125
6.1.4 β -シクロデキストリン修飾キトサンの合成	・・・126
6.1.4.1 アミノ化 β -シクロデキストリンと <i>N</i> -カルボキシ メチルキトサンの縮合	・・・127
6.1.5 β -シクロデキストリン修飾キトサンのシリカゲルへ の固定	・・・128
6.1.5.1 シリカゲルへのオキシラン環の導入	・・・129
6.1.5.2 β -シクロデキストリン修飾キトサンのシリカゲルへの 固定およびカラムの作製	・・・130
6.1.6 アミノ酸および類似化合物の2,4-ジニトロフェニル 誘導體化	・・・130
6.1.6.1 <i>D</i> -アラニンの2,4-ジニトロフェニル誘導體化	・・・131
6.1.6.2 <i>DL</i> -フェニルアラニンメチルエステルの2,4- ジニトロフェニル誘導體化	・・・132
6.1.6.3 <i>DL</i> -シトルリンの2,4-ジニトロフェニル誘導體化	・・・132
6.1.6.4 (<i>R</i>)-(+)-2-アミノ-3-フェニル-1-プロパノールの	

2,4-ジニトロフェニル誘導体化	・・・133
6.2 結果および考察	・・・133
6.2.1 キトサンおよび <i>N</i> -カルボキシメチルキトサンの構造	・・・133
6.2.2 アミノ化 β -シクロデキストリンの合成と同定	・・・142
6.2.2.1 β -シクロデキストリンのモノトシル化	・・・142
6.2.2.2 モノ(6- <i>O</i> - <i>p</i> -トリルスルホニル)- β -シクロデキストリンの アジド化	・・・147
6.2.2.3 モノ(6-アジド-6-デオキシ)- β -シクロデキストリンの還元	・・・147
6.2.2.4 モノ(6-アミノ-6-デオキシ)- β -シクロデキストリンの精製	・・・149
6.2.3 β -シクロデキストリン修飾キトサンの構造	・・・151
6.2.4 β -シクロデキストリン修飾キトサンのシリカゲルへの固定	・・・160
6.2.4.1 シリカゲルへのオキシラン環の導入	・・・160
6.2.4.2 シリカゲルへの β -シクロデキストリン修飾キトサンの導入	・・・160
6.2.5 HPLCによるキラル分離	・・・162
6.2.6 NMRによるキラル分離機構の検討	・・・171
6.2.6.1 2,4-ジニトロフェニルトリプトファン/ β -シクロデキ ストリン修飾キトサン包接錯体のNMRスペクトル	・・・173
6.2.6.2 2,4-ジニトロフェニルアラニン/ β -シクロデキストリン 修飾キトサン包接錯体のNMRスペクトル	・・・175
6.2.6.3 β -シクロデキストリン包接錯体の解離定数	・・・177
6.3 総括	・・・180
参考文献	・・・183
第7章 結論	・・・186
謝辞	・・・190

第1章 序論

1.1 研究の背景と目的

N-アセチルグルコサミンが β -1,4結合で直鎖状に連なったアミノ多糖であるキチンは、セルロースに次いで自然界に大量に存在するポリマーであり、エビ、カニ、昆虫の外殻などにタンパク質や炭酸カルシウムなどと結合したキチン質として存在している。分子構造は、Fig. 1-1に示したようにセルロースと類似しており、セルロースの2位のヒドロキシル基がアセトアミド基に置き換わっているだけである。キチンは溶解性が低く取り扱いが困難なポリマーであるが、濃いアルカリ中で脱アセチル化するとキトサンが得られる (Fig. 1-1)。中でも均一系でランダムに45~55%脱アセチル化したものは水溶性を示すようになり取り扱いやすくなる¹⁾。

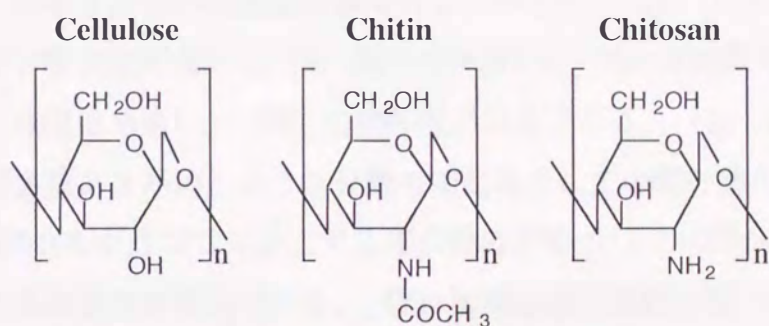


Fig. 1-1 Structures of cellulose, chitin and chitosan.

キチンとキトサンは組成による厳密な区別がなされていないが、市販キトサンは脱アセチル化度が80~85%程度であり、それ以上のものを一般にキトサンと呼んでいる。キトサンの精製品は白色の微粉末の状態で供給される。また、キトサンはアミノ基を構成ユニットに有しているため、蟻酸、酢酸などの有機酸中ではそれぞれの塩として溶解し水溶液とすることが出来る。

キトサンの産業的利用はセルロースのそれと比較すると非常に遅れており、近年その優れた性質が注目され活発に研究がなされ始めている。従来よりもっとも広く応用されてきたのは水処理への利用である。高分子凝集剤としての利用は、安全性への配慮から合成系のそれが利用できない場合、例えばタンパク質の回収再利用などにおいて利点を発揮する。また、ポリアクリル酸ナトリウ

ムとの併用による汚泥脱水法C S Aシステムも開発されている^{2,3)}。

一方、このような原材料的な利用以外に、キトサンが有するさまざまな特性を積極的に利用した研究がなされている。たとえば、高い成膜性と親水性を利用した、浸透気化法や気化浸透法によるアルコール分離膜⁴⁾ および膜中のアミノ基をキャリアーとする核酸塩基の輸送膜⁵⁾ に関する浦上らの分離膜材としての研究、高い金属吸着能および化学修飾の容易さに注目し、高度にキレート形成機能を強化した修飾体による金属イオン分離材料としての利用^{6,7)} などがある。また、キトサン自身を多孔質ビーズ化して生体触媒の固定化担体としたもの⁸⁾ はキトパール[®]の名称で市販もされており、母体となるキトサンが安全性に優れていることから、食品や医薬品の製造プロセスにおいて積極的に利用されている。これら以外にも、カプセル化細胞培養の膜材料⁹⁾ や化粧品¹⁰⁾、食品¹¹⁾、土壌改良材¹²⁾ など多方面での利用が報告されている。

キトサンの有する化学的特性や機能をまとめると、(1) アミノ基に由来する金属イオン配位能が高い、(2) 親水性が高い、(3) 可溶性のため成形が容易であり、成膜性も高い、(4) 化学修飾が容易である、(5) ポリマー中にキラル中心が多数あるため、キラル分離の固定相としての潜在能力を有する、(6) 構成単位をグルコサミンとする重合体のためポリマー鎖の決まった位置に規則的に修飾部位を導入できる、(7) 接触溶媒の極性の違いにより膨潤収縮性を示す、(8) 元来天然物由来のため食品、化粧品産業などへの利用に際して安全性に優れていることなどが挙げられる。化学修飾により、キトサンの元来有するこれらの機能・特性を増強または新たな機能を付与した新しい材料を創生すると、広範な分野での高度な利用が可能となる。

本研究の目的は、上述したようなキトサンの有するさまざまな化学的特性や機能を高度化した化学修飾体を合成し、それを化学センサの応答部位あるいはHPLCにおけるキラル固定相へ用いて分析化学的な利用を図ることである。キトサンを化学修飾し積極的にその特性を高度化して利用する研究はまだその緒についたばかりであり、機能性新素材としての魅力を十分備えた天然高分子として、その利用・発展が大いに期待されるものである。

なお、本論文中で作製した、応答原理の異なるそれぞれのセンサがターゲットとしている分析対象物の研究背景、および従来報告されているそれらの分析

方法等に関しては、第2章以降の各章毎に詳述する。

1.2 本論文の概要

本論文は7章から構成されている。

第1章は序論で、キトサンの構造から期待できる化学的特性、およびその性質とキトサンの従来における産業的利用との関連性について述べた。

第2章では、キトサンのもっとも基本的な性質である、金属イオンに対する親和性の高さをベースにして、化学修飾により特定の金属イオンに対する選択性を高めた修飾体の合成、及びその金属イオンセンサへの利用について述べた。タイプの異なる2つのセンサを作製し、それぞれの応答特性について検討した。まずN-(2-ヒドロキシベンジル)キトサン膜を応答部位としたグラッシーカーボン修飾電極を作用極とする、サイクリックボルタンメトリー法により、銅と鉛イオンの選択的な分析に関して述べた。次に、ピリドキサル類似体で修飾したキトサン膜を応答部位とする二股型蛍光光ファイバセンサの、亜鉛イオンに対する選択的な応答について述べた。

第3章では、キトサンの親水性の高さを利用した、微量水分分析用の光ファイバセンサについて述べた。ピレンカルボキシアルデヒド誘導体で修飾したキトサン膜は、有機溶媒中で強い蛍光を発する。微量水分の存在はこの蛍光強度の低下を引き起こすため、有機溶媒中の微量水分定量用の蛍光センサ感応膜としての利用を可能にした。

第4章では、キトサンの水と有機溶媒に対する膨潤収縮性の違いを利用した、水中有機溶媒測定用の内部全反射型の光ファイバセンサを作製した。クラッドを剥離した石英光ファイバにキトサン/ポリビニールアルコール (PVA) 膜を新たにクラッドとして被覆したロッドを応答部とする光ファイバセンサの、水中有機溶媒に対する応答原理を明らかにするとともに、各種有機溶媒の比誘電率、蒸気圧およびキトサン/PVA膜に与える収縮率や屈折率の変化と応答特性との関連性を検討した。テフロン保護膜の効果についても述べた。また、応用例として、水中ハロゲン化炭化水素及びエタノールの定量を取り上げ、特にエタノールに関しては各種酒類中のアルコールセンサとしての実用性を明らかにし、リアルタイムな分析法として工程管理などへの利用を示唆し

た。

第5章では、前章のキトサン/PVA感応膜をスルフォフタレイン色素で修飾することで酸への選択性を高めることができることを述べた。色素の種類、吸着量の応答に与える影響を検討した。有機酸の構造と応答の関係より、より疎水的な置換基を有する有機酸に対する応答感度が高いことが分かった。また、実試料分析に際してのテフロン保護膜の効果についても述べた。

第6章では、キトサンが潜在的に有するキラル認識能の発現に関して検討した。β-シクロデキストリンで修飾したN-カルボキシメチルキトサン(β-CD-NCMC)を合成しその構造を明らかにした。次にβ-CD-NCMCを共有結合で固定化したシリカゲルがDNP-アミノ酸のキラルHPLC分離に有効な固定相として働くことを述べた。種々のDNP-アミノ酸のキラル分離を検討した結果、β-CD-NCMCはDNP部位とアミノ酸の置換基部位間の距離、及び置換基部位の大きさによってDNP-アミノ酸を厳密にキラル認識していることを明らかにした。さらにHPLCの結果とNMRを用いた包接挙動の検討から、高密度にβ-CDで置換されたβ-CD-NCMCは、隣接する2つのCD環にDNP-アミノ酸の二つの疎水部位が協同的に包接されるような場を提供していること、また、環への浅い包接が高いキラル分離発現に必要なこと、さらにはDNP-アミノ酸のカルボキシル基とβ-CD-NCMC間の水素結合も重要な役割を果たしていることを示唆した。

第7章は総括的結論で、本研究で得られた結果を総括した。

以上、本論文ではキトサンが本来有するいくつかの特性、機能を化学修飾により積極的に高度化して、得られた修飾体を種々のタイプのセンサプローブやキラル固定相とすることで分析化学的な利用を図った。

参考文献

- 1) K. Kurita, T. Sannan, Y. Iwakura : *Makromol. Chem.*, **178**, 3197 (1977).
- 2) 橋本正憲, 石井保彦, 大井康裕 : 日本特許公開公報, 昭 59-33440 (1980).
- 3) 大井康裕, 橋本正憲 : *PPM*, **12**, 6, 32 (1981).
- 4) T. Uragami, K. Takigawa : *Polymer*, **31**, 668 (1990).

- 5) T. Uragami, T. Kato, H. Nagayasu, I. Yura : *Carbohydr. Polym.*, **21**, 289 (1993).
- 6) 井上勝利 : 分離技術, **26**, 286 (1996).
- 7) 井上勝利, 大渡啓介, 吉塚和治, 新原隆司, 喜納兼勇, 分析化学 (Bunseki Kagaku), **44**, 283 (1995).
- 8) 谷辺博昭 : "キチン・キトサンの応用", キチン・キトサン研究会編, p. 123 (1990), (技報堂出版).
- 9) T. Yoshioka, R. Hirano, T. Shioya, M. Kato, *Biotechnol. and Bioeng.*, **35**, 66 (1990).
- 10) 三田康蔵 : "キチンキトサンの開発と応用", p. 202 (1987), (工業技術会).
- 11) 平野茂博 : "別冊フードケミカル, キチン/キトサンの科学", p. 1 (1987), (食品化学新聞社).
- 12) K. Adachi, M. Kobayashi, E. Takahashi : *Solid. Sci. Plant. Nutr.*, **33**, 245 (1987).

第2章 金属イオンセンサプローブとしての利用

金属イオンに対する高いキレート形成能¹⁾はキトサンのもつ化学的な特性のうち、もっともプリミティブな性質である。キトサンを化学修飾して、この特性をさらに改質・改善して分析化学的に利用することは初めに検討されるべきテーマであろう。

キトサンのキレート形成能は、その構成単位である2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコースつまりグルコサミンの2位のアミノ基に由来する。このアミノ基を化学修飾することでキトサンのもつキレート形成能が変化・向上することはよく知られている。例えば、*N*-(2-ヒドロキシベンジル)キトサン (HBC)の銅イオンに対する吸着容量はキトサン自身より47倍も増加することが報告されている²⁾。また、一連のコンプレキサン型の配位子、例えばエチレンジアミン四酢酸やジエチレントリアミン五酢酸で修飾したキトサンは鉛イオンに対して選択的な吸着を示すようになる^{3,4)}。興味あることに、キトサンを前もって銅イオンと錯体を形成させた状態でクロロメチルオキシランを用いて架橋したものは、銅イオン吸着の選択性が増加し、いわゆる鋳型効果を示すことはすでに我々が報告した現象である⁵⁾。

一方、従来より、金属イオンに対して選択的な、あるいは濃縮効果のある媒体や試薬で修飾された電極を用いた、ボルタンメトリックな定量が多数報告されている。よく利用されるのは、2,9-ジメチル-1,10-フェナントロリン⁶⁾ やビス(カルボキシメチル)アミノ基を有する架橋処理したポリスチレンなどのキレート配位子である。上述したように、キトサンやその誘導体も高いキレート形成能を有しているため同じような修飾電極膜材料として有効な働きをすると期待される。本章の前半部分では、HBCで修飾したグラッシーカーボン電極を用いるサイクリックボルタンメトリーによる銅、鉛イオンの定量について述べる。このボルタンメトリーはレセプター機能をもつHBCとトランスデューサー機能をもつ電気化学デバイスを構成要素とするセンサと考えることができ、選択性は配位子であるHBCのキレート生成定数の金属イオン間での差および生成したキレートの還元電位の違いから発現している。本章の後半部分ではキトサンとピリドキサル類似体 (5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-

2-メチルピリジン：FHMP) から形成したシッフ塩基を応答部位とする高感度の光ファイバ垂鉛センサについて述べる。光ファイバセンサは、電気的なノイズの妨害を受けない、生体試料中のin vivo分析が可能のように微小化が容易である、遠隔測定に適している、リアルタイムな分析が可能であるなどの利点を有しており、その形状を含めた一般的な作製法は多数提案されている。例えば、蛍光性試薬の2',3,4',5,7-ペンタヒドロキシフラボン（モリン）を羊の筋肉から得られた生体膜⁷⁾ やセルロース粉末⁸⁾ に固定化させた二股型光ファイバセンサでアルミニウムが定量されている。またスチレン-ジビニルベンゼンのマイクロビーズに吸着させた1,5-ジフェニルカルボヒドラジドの吸光度変化による光ファイバセンサを用いた1 ppm以下の六価クロムの定量⁹⁾ や、可塑性したPVC膜中にカリックスアレンとクロモイオノフォア（一連のフェノキサジン誘導体）を取り込ませたナトリウム¹⁰⁾ およびカリウムイオン¹¹⁾ のセンサ、さらにはナフイオン膜に1-(2'-ピリジルアゾ)-2-ナフトールを吸着させたものを応答部位とするセンサでの 10^{-5} mol dm⁻³レベルのニッケルイオンの定量¹²⁾、また銀イオンに選択的なアクリジニウム色素をPVC応答膜に含んだ銀イオン光ファイバセンサ¹³⁾ など非常に多彩な膜材料と応答性物質の組み合わせでなされているが、構成の基本概念は、すでに溶液系で金属イオンとの反応が知られているクロモフォアやフルオロフォアのセンサ応答膜への固定が基礎になっている。

一方、一般的に芳香族のシッフ塩基の金属錯体は蛍光性を示すことが知られており、垂鉛¹⁴⁾、アルミニウム^{15,16)}、マグネシウム¹⁷⁾、ガリウム¹⁸⁾ およびベリリウム¹⁹⁾ の各イオンの定量に用いられている。また、これらのうちのいくつかは血漿¹⁷⁾、人の尿¹⁸⁾、ベリリウム銅合金^{18,19)} などの実試料に応用され高い感度と選択性が報告されている。これらのことは、シッフ塩基を容易に形成するキトサンの場合にもこれらの金属イオン蛍光分析への応用が可能なることを示唆している。事実、前田らはピリドキサーールとアミノ糖とのシッフ塩基垂鉛キレートの強い蛍光を利用した垂鉛イオンの分析について報告している²⁰⁾。本実験でも当初は発蛍光性部位の構築にピリドキサーールで修飾したキトサンを用いることを試みた。しかし、得られた修飾体がどの溶媒にも不溶で利用できなかったこともあって、ピリドキサーールの代わりにその類似体である

FHMPとキトサンとのシッフ塩基を用いた。なお、この報告の後、炭酸脱水素酵素の活性部位に亜鉛が存在する時のみに同じサイトにダンシルアミドの取り込みが起こり、強い蛍光を発するようになるという原理を利用した光ファイバ蛍光バイオセンサによって数十から千 nmol dm^{-3} の亜鉛定量が報告された²¹⁾。

2.1 *N*-(2-ヒドロキシベンジル)キトサン修飾電極による銅および鉛イオンの微量分析

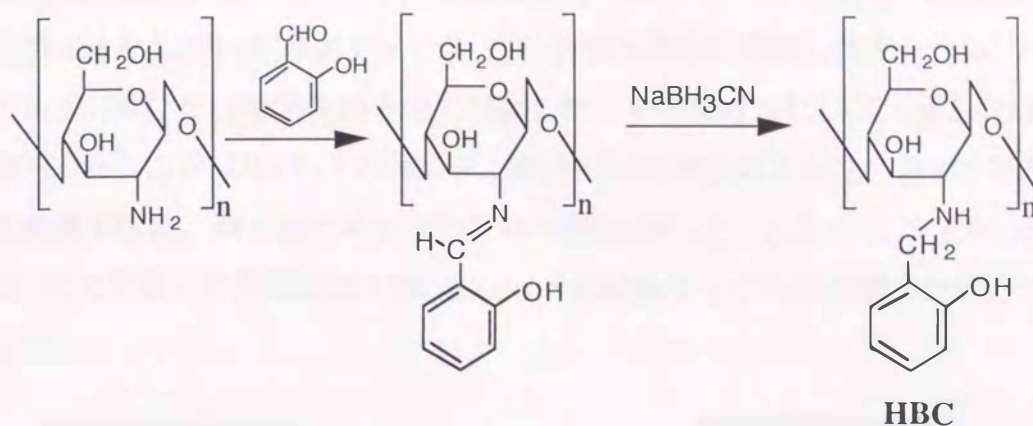
2.1.1 試薬および装置

キトサンは加ト吉製の脱アセチル化率95%のもの(100L, YJ24-M)を用いた。水は逆浸透純水装置(ミリポア, Milli-RO15)とイオン交換装置(ヤマトWA-550)を通したものを使用した。サリチルアルデヒド(SA)は和光一級を減圧蒸留後、アセトニトリルは水素化カルシウム存在下蒸留したものを用いた。*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)は、和光一級品を使用直前に減圧蒸留して用いた。銅、鉛、ニッケル、コバルト、ウラニル、カドミウムの各硝酸塩は和光特級品をそのまま使用した。電極用のグラッシーカーボン(GC)は東海カーボンRA-6-300, GC-30S(直径6 mm)を用いた。電極の鏡面研磨には研磨布(不二見研磨Surfin 018-3)と研磨剤(不二見研磨Metapolish F. M. No. 4, 粒径=0.5 μm)を用いた。その他の試薬は和光特級をそのまま用いた。

IRスペクトルは日立製270-50型赤外分光光度計で得た。サイクリックボルタンメトリーは北斗電工HA-301型ポテンションスタットとHB-104型ファンクションジェネレーターおよび横河3086X-Yレコーダーを用いて行った。測定には銀・塩化銀電極と白金電極をそれぞれ参照電極および対電極としたH型三極セルを用いた。

2.1.2 *N*-(2-ヒドロキシベンジル)キトサンの合成

平野ら²²⁾とHallら²⁾の方法に従って合成した(Scheme 2-1)。キトサン112mg(グルコサミンユニットに換算して 6.96×10^{-4} mol)を2%酢酸水溶液10mlに溶解させた後、SA42.4mg(3.48×10^{-4} mol)を含むメタノール10mlを加え室温で30分間攪拌すると黄色のシッフ塩基が生成した。これにシアノ水素化ホウ素ナトリウム42.4mg(6.75×10^{-4} mol)を含む水0.5mlを添加



Scheme 2-1 Synthesis of HBC

すると溶液の色が消失した。室温で一晩攪拌後 1 mol dm^{-3} 水酸化ナトリウム水溶液でpH8.0にすると白色ゲルが生じた。水120ml (40 ml x 3) とメタノール80ml (40ml x 2) で洗浄後凍結乾燥して白色粉体のHBCを得た。

2.1.3 修飾電極の作製

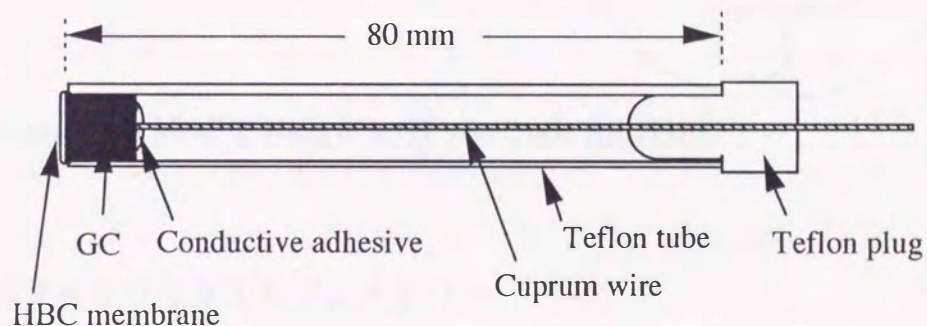
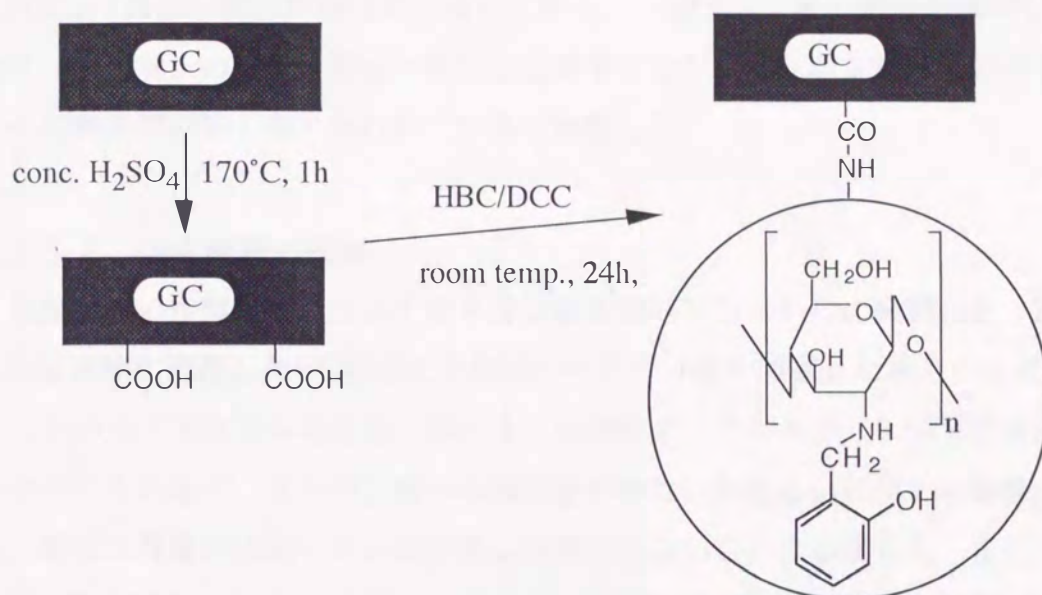


Fig. 2-1 Structure of a GC electrode modified with HBC

作製したGC電極の構造をFig. 2-1 に示す。まず長さ8cmにカットしたテフロンスパゲッティチューブの片端を加熱して柔らかくした後、長さ5mmにカットした直径6mmのGCをはめ込み銅線を導電性接着剤で接着し、テフロン栓で脱着しないように押さえた。次に、GCの表面を1200番エメリー紙とアルミナ研磨剤で鏡面研磨した後、GC先端部を61%硝酸に室温で30分間浸漬し、さらに濃硫酸に170°C60分間浸漬して表面を酸化した²³⁾。これを蒸留水

に30分間浸漬洗浄後120°Cで2時間乾燥した。続いて、GC表面にHBC溶液（HBC 4mgを1mlの30%メタノール/2%酢酸水溶液に溶解したもの）10 μ lを滴下して120°Cで14時間乾燥させて製膜した。その後直ちにDCC 2gを含むDMF-アセトニトリル(1:1)20ml中、室温で24時間反応させた。次にDMF, 2%酢酸水溶液, 水の順にそれぞれ30分浸漬洗浄した。以上の操作 (Scheme 2-2) により得られた電極は0.05mol dm⁻³の硝酸カリウム水溶液中に浸して保存した。



Scheme 2-2 Modification of a GC electrode with HBC

2.1.4 サイクリックボルタンメトリー

所定濃度の金属イオンを含む0.05mol dm⁻³の硝酸カリウム水溶液中に修飾電極を一定時間浸漬した後、少量の水で洗った。その電極を、前もって窒素ガスをバブリングして脱酸素した、0.05mol dm⁻³の硝酸カリウム水溶液を満たしたCV測定用のH型三極セル装置にセットし、25.0 \pm 0.5°Cの一定温度下でCVを測定した。取り込まれた金属イオンは、CVにより一旦還元した後酸化しその酸化ピーク面積で評価した。再現性のあるピークを得るため、測定は取り込み後の1回目のボルタモグラムで評価した。繰り返し測定する場合、電極を0.1 mol dm⁻³ EDTA水溶液に10分間浸漬した後、水に30分浸漬洗浄してから次の測定に移った。

2.1.5 結果と考察

2.1.5.1 *N*-(2-ヒドロキシベンジル) キトサンの合成

IRスペクトル (Fig. 2-2(b)) から, SAとの反応で新たに 1640cm^{-1} のイミノ基の吸収および 760cm^{-1} に芳香環の吸収が見られたことから Schiff塩基の生成が確認できた. これを還元すると芳香環の吸収は残っているが 1640cm^{-1} の Schiff塩基の吸収が消失した (Fig. 2-2(c)). また, 1650cm^{-1} および 1100cm^{-1} 付近の吸収が残っていることから, 一級アミノ基の残存も示唆しており, キトサンのアミノ基を一部残した形でのヒドロキシベンジル基のキトサンへの導入は目的どおり行われていると判断した.

2.1.5.2 修飾電極の作製

修飾電極の作製方法についてキトサン膜を用いてあらかじめ検討した. Fig. 2-3(a)は酸化処理したGC電極に未修飾のキトサン膜を製膜した場合のサイクリックボルタモグラムである. 鉛イオンの酸化ピークのみが -0.57V にわずかに見られるのみで, キトサン膜への濃縮量が少ないかあるいは膜の密着性が悪く, 電気二重層内に鉛イオンが少量しか存在しないことを示唆した. また, 2回目以降の測定ではほとんどピークが見られず, CV操作後の膜の剥離も見られたことから, 物理吸着のみによる膜調製法では不都合なことが分かった. これをDCCで処理しGCにキトサンを共有結合させると安定な膜が得られ, 繰り返し測定が可能になった. また感度も増加し (Fig. 2-3(b)) 取り込まれた鉛イオンが還元され続いて酸化反応を受けるほど十分に電極表面に接近していることを示唆する. Fig. 2-3(c)はDCC処理したHBC修飾電極の結果である. DCC処理のキトサン膜に比較しさらに感度が5倍ほど増大した. これらのピークは Pb^{2+} の2電子還元・酸化に起因していると考えた. なおDCCによりHBC膜を共有結合させた後のGC鏡面には薄膜による干渉縞がみられ, 処理前の膜状態と全く同じであったことから, 反応による膜表面の劣化や剥離は起こっていないと判断した. 以上述べた3種類の電極のそれぞれの膜は調製時にグルコサミンユニットのモル数が同じになるように調製した. それぞれの酸化電位の違いは鉛イオンが異なる配位形態によって膜中に取り込まれていることを示してい

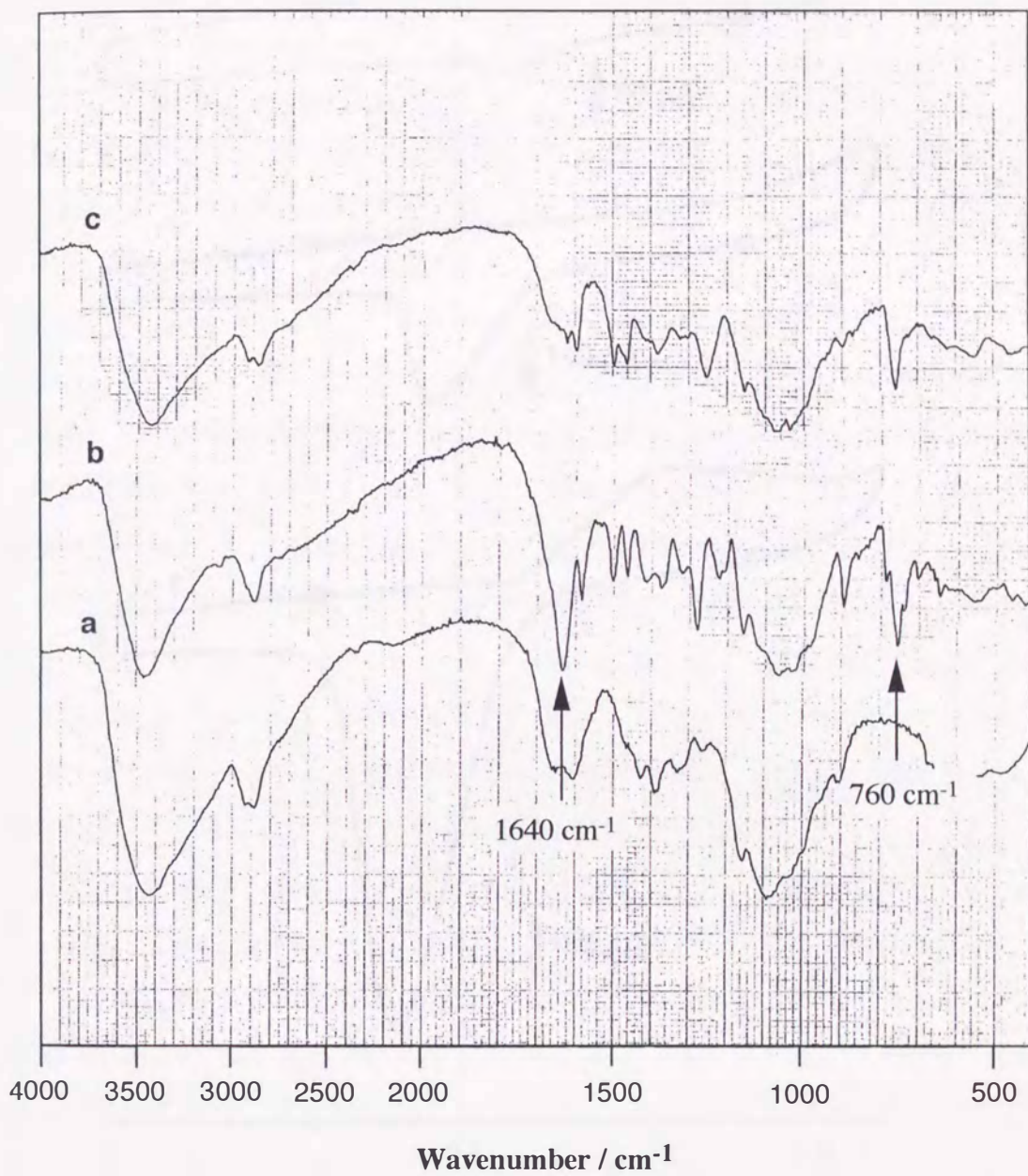


Fig. 2-2 IR spectra of (a) chitosan , (b) salicylidenechitosan and (c) *N*-(2-hydroxybenzyl)chitosan.

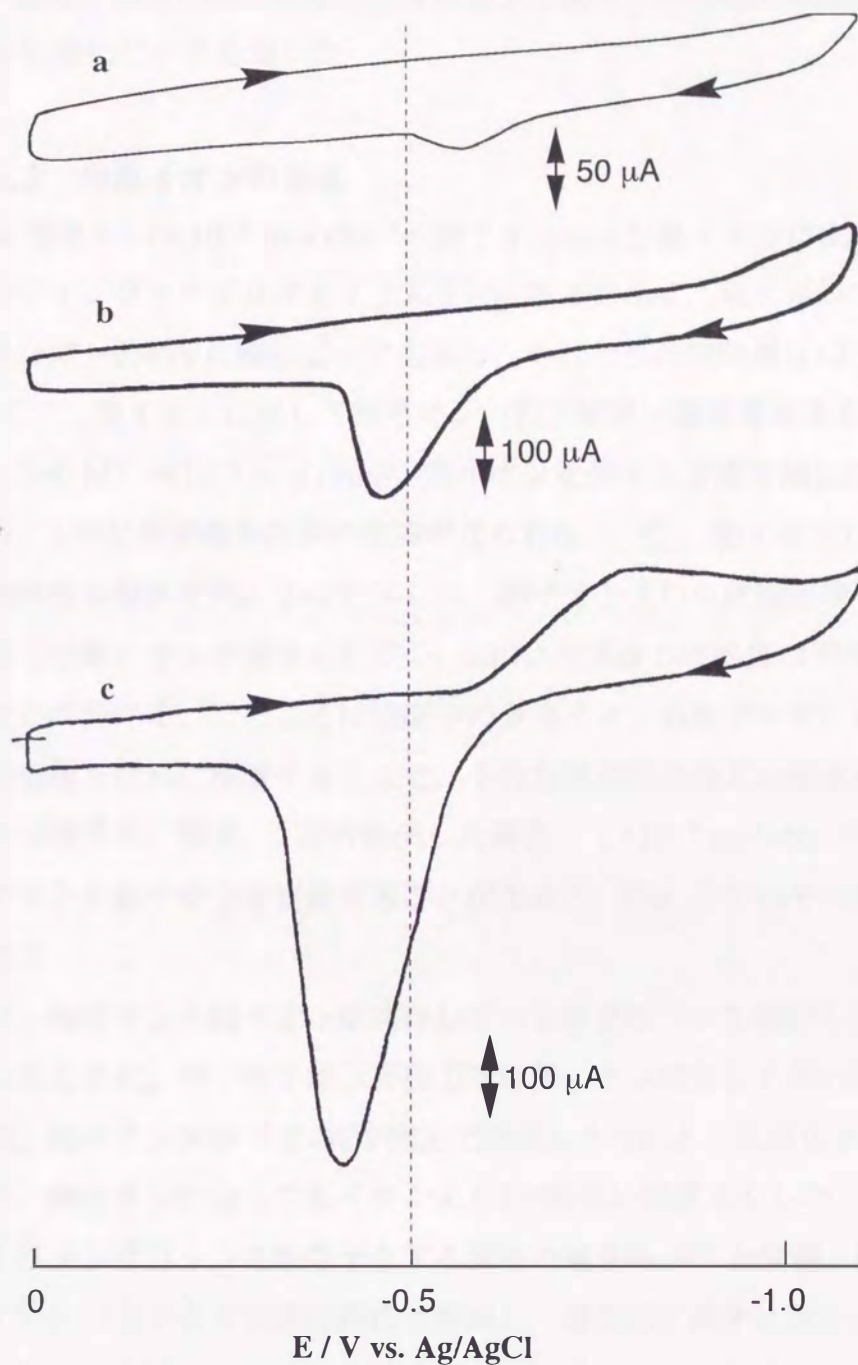


Fig. 2-3 Cyclic voltammetric I-E curves after soaking in $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Pb}^{2+}$ obtained with GC electrodes covered with (a) a chitosan membrane, (b) a chitosan membrane treated with DCC and (c) a HBC membrane treated with DCC. Scan rate, 100 mVs^{-1} ; soaking time, 60 min; electrolyte, $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$.

る。Fig. 2-3(c)と同じ調製法で得られた電極は、ロットによる応答量の違いが大きなもの約2倍ほどの開きがあったが、同じ電極を用いる限りは、10回の濃縮/測定/再生の繰り返しで±4%以下であり、30日間100回測定後も初めの90%の酸化ピークを保った。

2.1.5.3 金属イオンの測定

HBC電極を $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ の銅イオンおよび鉛イオンに60分間浸漬した場合のサイクリックボルタモグラムをFig. 2-4に示す。銅イオンで+0.04V、鉛イオンで-0.45Vに酸化ピークを示し、それぞれの電荷量は $132 \mu\text{C}$ および $273 \mu\text{C}$ で、鉛イオンに対して銅イオンの約2倍高い濃縮選択性を示した。

Fig. 2-5は $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ の銅イオンに対する浸漬時間と応答量の関係である。180分浸漬後も応答の増加が見られた。一方、鉛イオンに対する応答と浸漬時間との関係をFig. 2-6に示した。銅イオンよりも感度が高く、また低濃度試料では銅イオンの場合と同じく、200分浸漬後も応答量が平衡に達していないことが分かる。このことは検液中の金属イオン濃度が非常に低い場合でも長時間電極を試料に浸漬することで、十分定量可能なほどの濃度に濃縮できることを示唆する。事実、120分浸漬した場合、 $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ の低濃度域での銅イオンと鉛イオンを定量することが出来た、Fig. 2-7はその濃度域の検量線である。

次に、銅イオンと鉛イオンが共存している場合について検討した。Fig. 2-4に示したように、単一のイオン存在下では鉛イオンに対して高い感度を示したが、銅、鉛イオン共存下でのCV測定ではFig. 2-8のようなボルタモグラムが得られ、銅イオンに対して鉛イオンより2.9倍高い感度を示した。これは、N-サリチリデングリシンを配位子とする錯体の場合^{24, 25)}と同様、鉛イオンよりも銅イオンの方がより安定な錯体を形成し、優先的に膜中に取り込まれるためと考えられる。単一のイオン存在下での銅イオンへのより低い応答は、強く配位した銅イオンが膜の収縮を引き起こし、膜中への物質移動を起こりにくくしているためと推測される。

銅、鉛イオンそれぞれの応答が片方のイオン存在下でどのような影響を受けるかを示したのがFig. 2-9である。目的とするイオンを $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ に

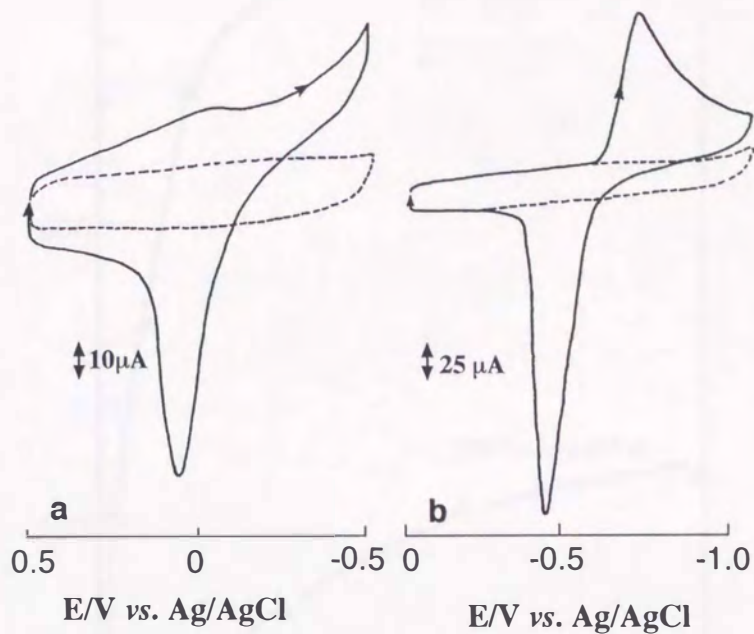


Fig. 2-4 Cyclic voltammetric I-E curves after soaking in (a) $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Cu}^{2+}$ and (b) $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Pb}^{2+}$ solutions. Scan rate, 100 mV s^{-1} ; soaking time, 60 min; electrolyte, $0.05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$. Dashed lines represent the curves before soaking.

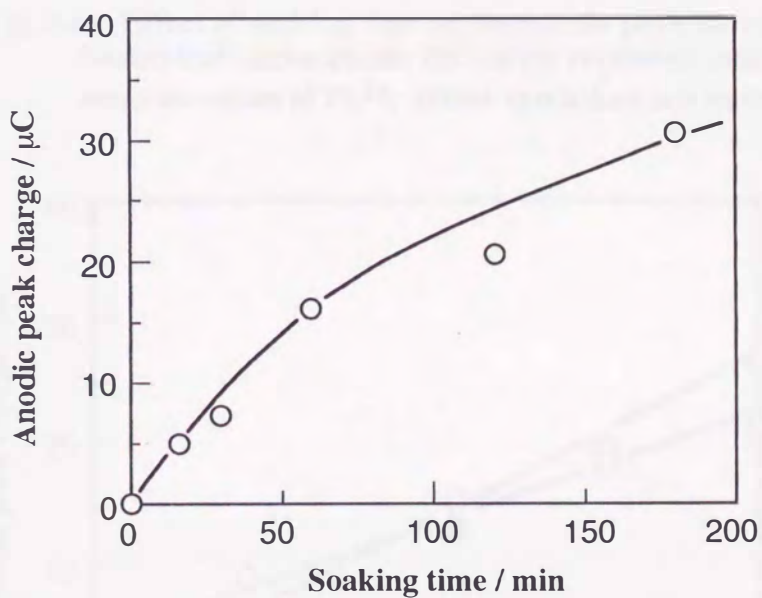


Fig. 2-5 Effect of soaking time on the anodic peak charge of $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Cu}^{2+}$. Other conditions are as in Fig. 2-4.

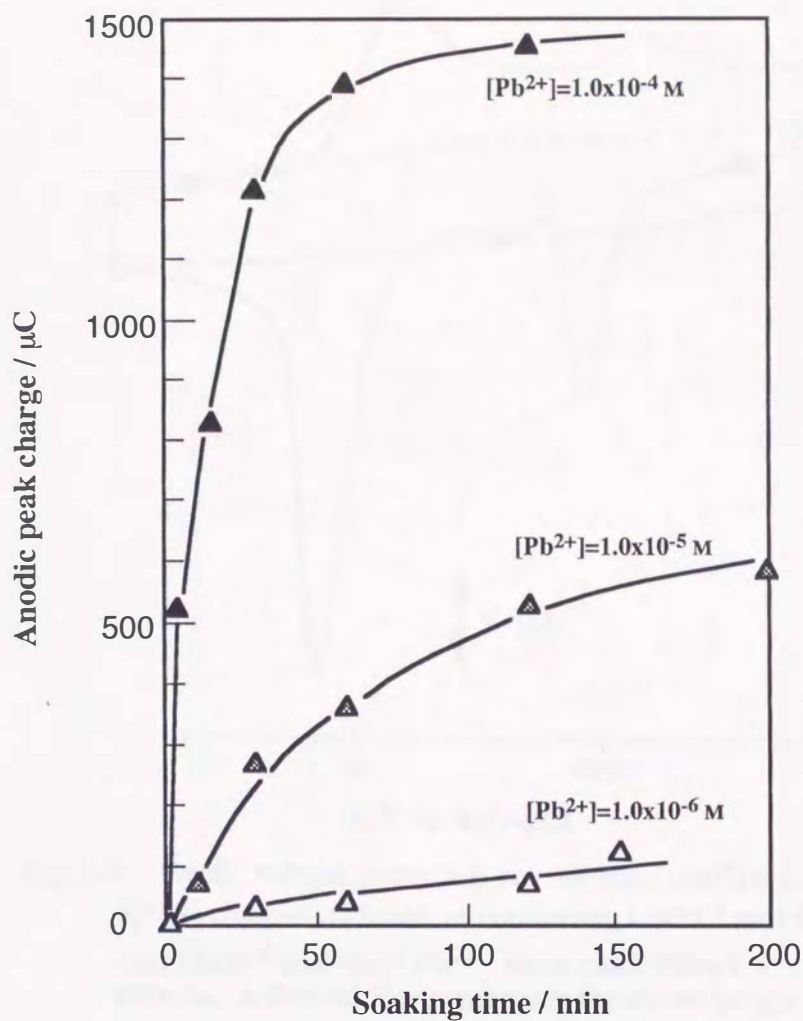


Fig. 2-6 Effect of soaking time on the anodic peak charge of Pb^{2+} . Numerical values beside the curves represent molar concentrations of Pb^{2+} . Other conditions are as in Fig. 2-4.

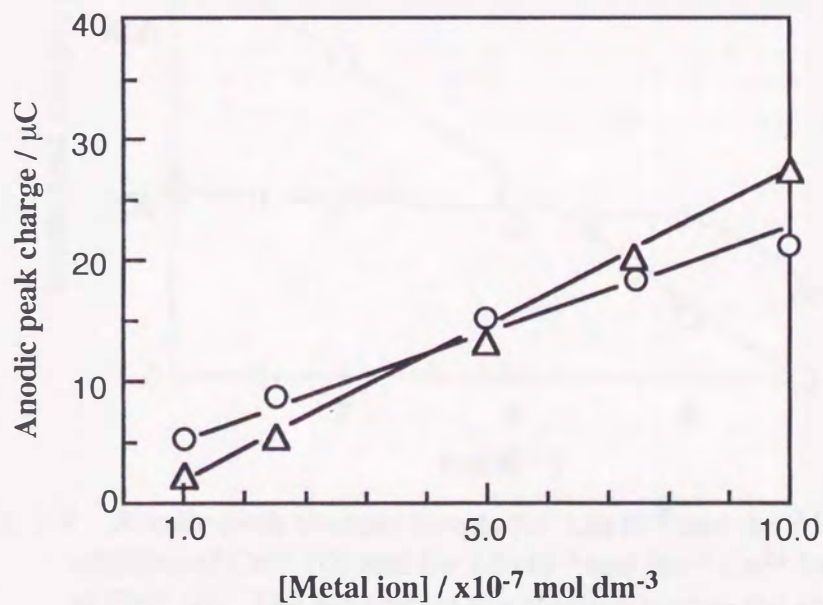


Fig. 2-7 Calibration curves for Cu^{2+} (O) and Pb^{2+} (Δ) after 120-min soaking. Other conditions are as in Fig. 2-4.

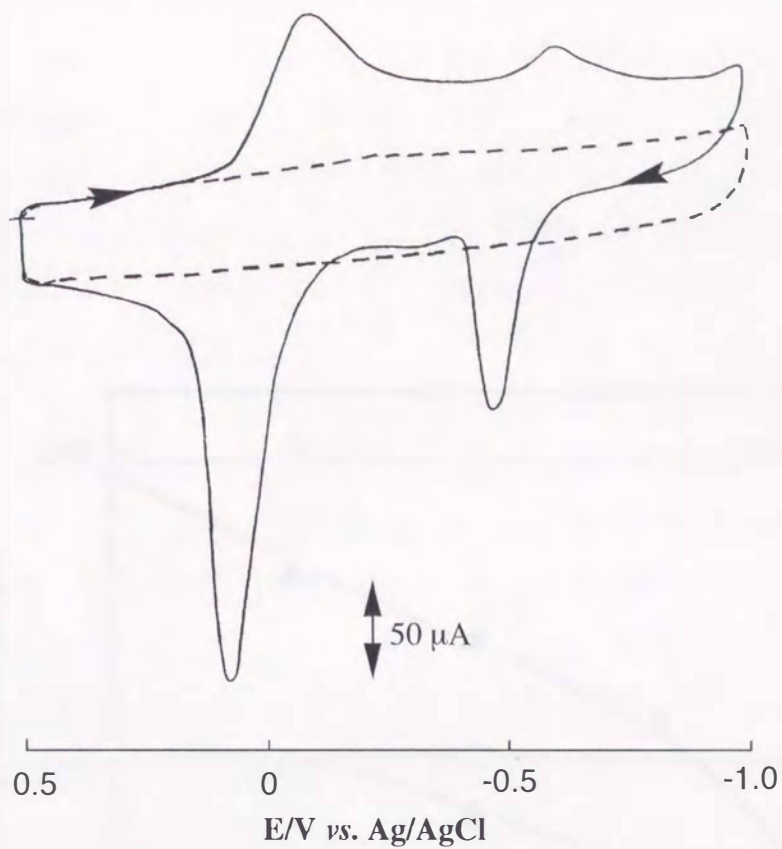


Fig. 2-8 Cyclic voltammetric I-E curves after soaking in 0.1 mol dm^{-3} KNO_3 electrolyte solution containing $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ Cu^{2+} and $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ Pb^{2+} . Scan rate, 100 mV s^{-1} ; soaking time, 60 min. A dashed line represents the curve before soaking.

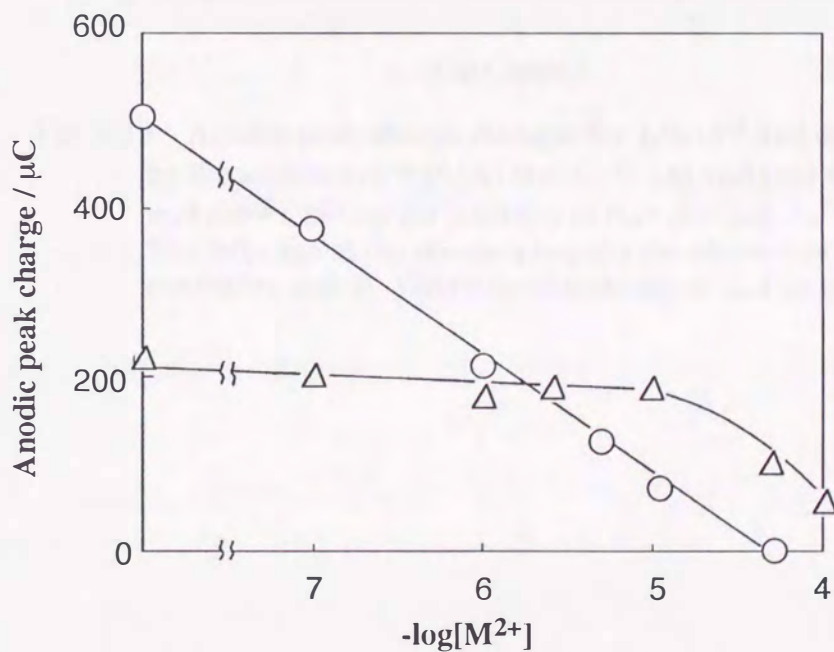


Fig. 2-9 Anodic-peak charge changes for $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ Pb^{2+} by the addition of Cu^{2+} (O) and for $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ Cu^{2+} by the addition of Pb^{2+} (Δ). The left edge of the abscissa implies the absence of the coexisting divalent cation. Other conditions are as in Fig. 2-8.

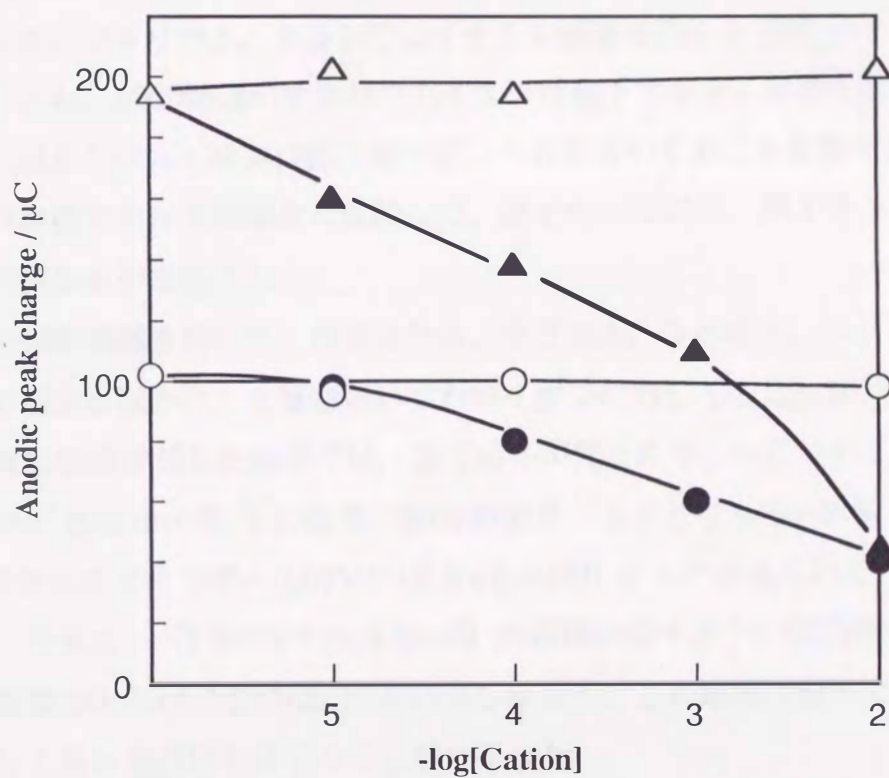


Fig. 2-10 Anodic-peak charge changes for $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Pb}^{2+}$ by the addition of Na^+ (Δ) and Ca^{2+} (\blacktriangle) and for $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Cu}^{2+}$ by the addition of Na^+ (\circ) and Ca^{2+} (\bullet). The left edge of the abscissa implies the absence of the coexisting cation. Other conditions are as in Fig. 2-8.

固定して、片方を百分の一 ($1.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) から5倍あるいは10倍の濃度まで共存させたときの応答の変化として示した。鉛イオンの応答量は銅イオン不在下では高い応答を示したが、少量の銅イオン存在で影響を受けており5倍モルの銅イオン存在下ではほとんど応答を示さなくなった。一方、銅イオンは応答量は低いが、同濃度の鉛存在下でもほとんど影響を受けていない結果が得られた。

さらに、ナトリウム、カルシウムイオンの影響をFig. 2-10に示す。鉛、銅イオンとも、1000倍量のナトリウムイオン存在下でも全く影響を受けなかったが、カルシウムイオンは鉛、銅イオンへの応答いずれにも影響を及ぼし、10倍の共存量で不在下の場合に比較して、鉛イオンで30%、銅イオンで20%の応答の減少を引き起こした。

この修飾電極を用いて、カドミウム、ウラニル、コバルト、ニッケルの各イオンの測定を試みた。4種類のいずれのイオンに対しても $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ の溶液に60分浸漬した結果では、全く応答が見られなかった。そこで、濃度を $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ にした結果、60分浸漬後、カドミウムで -0.67 V に $64.1 \mu\text{C}$ 、ウラニルイオンで -0.07 V に $15.3 \mu\text{C}$ の酸化ピークが見られた。これらの値は、千分の一 ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) の濃度の鉛イオンに60分浸漬したときの応答量 $233.5 \mu\text{C}$ の27%および6.5%しかなく、この電極は鉛および銅イオンに対して高い選択性を有することが分かった。

2.2 ピリドキサール類似体で修飾したキトサンを感応部とする光ファイバ蛍光センサを用いた亜鉛イオンの定量

本節では、キトサンとピリドキサール類似体、FHMPから形成したシッフ塩基を応答部位にもつ亜鉛定量用の光ファイバ蛍光センサについて述べる。

2.2.1 試薬および装置

塩酸ピリドキシンは和光試薬特級をそのまま用いた。ピリジンはBaO存在下蒸留した。DMF、DMSOはCaH₂で乾燥後減圧蒸留した。DCCとプロモ酢酸は減圧蒸留して用いた。キトサンは加ト吉製の95%脱アセチル化したものを、アガロースはドータイト電気泳動用(アガロースI)を、またN-カルボベンジロ

キシ-4-アミノブタン酸 (*N*-CBZ-4-ABA) は東京化成より購入したものをそのまま用いた。水は逆浸透膜 (ミリポア, Milli RO15) を通過させ精製後ヤマト科学製オートスチルWA-550でイオン交換したものをを用いた。亜鉛イオンの母液はキシダ化学の過塩素酸亜鉛から調製した。その他の試薬は、いずれも特級品をそのまま用いた。

IRスペクトルは日立製270-50型赤外分光光度計を、紫外可視吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルは日本分光UVIDEC-610A型分光光度計と島津RF-510型蛍光分光光度計をそれぞれ用いて測定した。NMRは日立製R-24B核磁気共鳴装置(60 MHz)を使用して測定した。

光ファイバセンサ計測システムはFig. 2-11に示すように、ウシオ製USH-500D型超高圧水銀灯を光源とし、NF製 CH-353型チョッパーで変調した後、東芝製UV-D36Aフィルタと島津-ボシュロム製モノクロメーター (1350本/mm) で365 nmの励起光を取り出した。これを二股型石英製光ファイバ (昭和電線電纜SF-S400/500; 直径0.5mm) の一端から導入し、直径1mmの同社製光ファイバSF-S800/1000の先端に取り付けた感応部を照射した。感応部からの蛍光はもう一方の光ファイバを用いて東芝製UV-Y39フィルターを通過した後浜松ホトニクス製R105光電子増倍管で検出し、NF製5600Aロックインアンプを通して信号を記録計に取り出した。

2.2.2 5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-2-メチルピ

リジンによるキトサンの修飾

まず、Scheme 2-3²⁶⁾ に従って塩酸ピリドキシンの3位のヒドロキシル基と4位のヒドロキシルメチル基の保護を行った後、5位ヒドロキシメチル基を酸化した。その後、加水分解による脱保護基を行ってFHMPを合成した。次に、Scheme 2-4に従って、キトサンのアミノ基と*N*-CBZ-4-ABAを縮合し側鎖をのばした後、加水分解さらにプロモアセチル誘導体を合成した。その後、FHMPとの反応によりFHMP修飾キトサン(FHMP-C)を合成した。

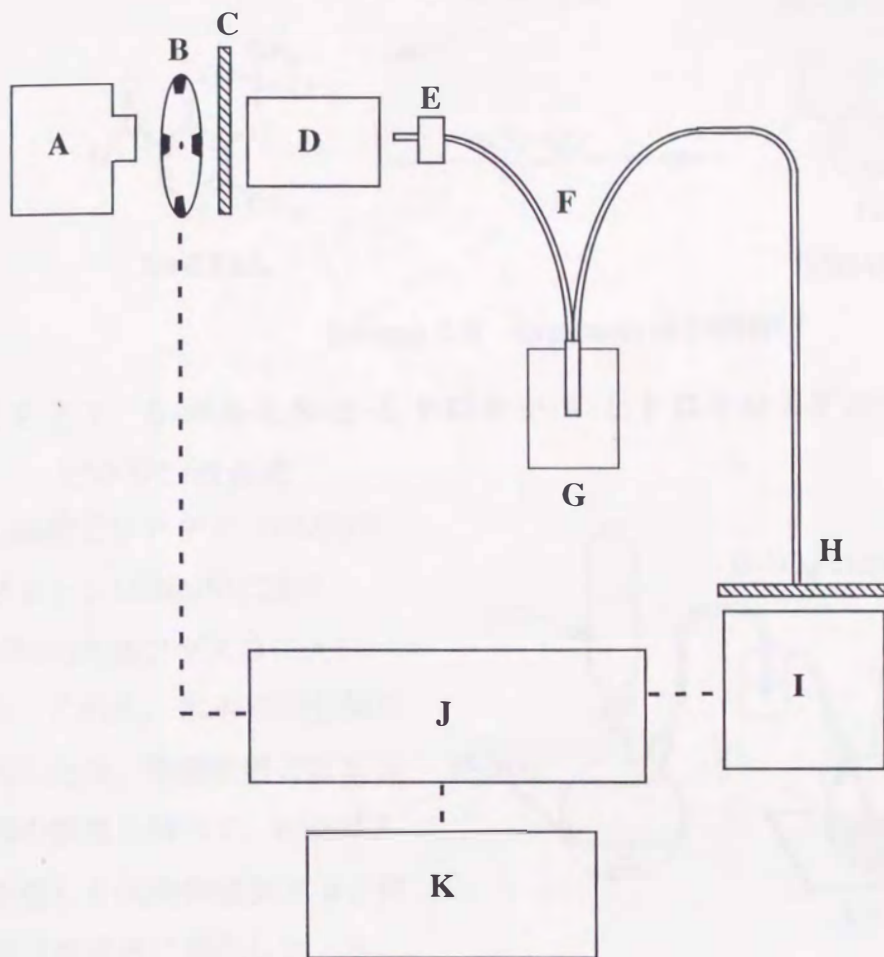
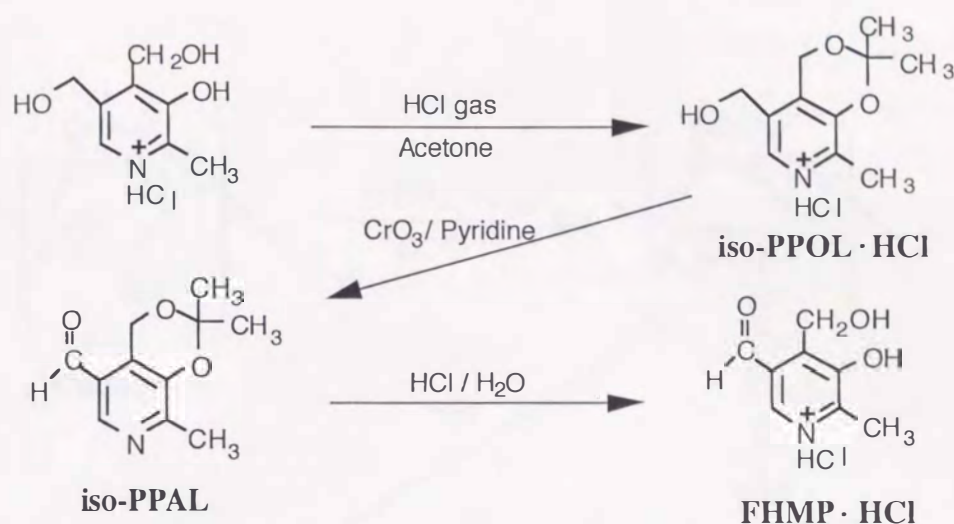


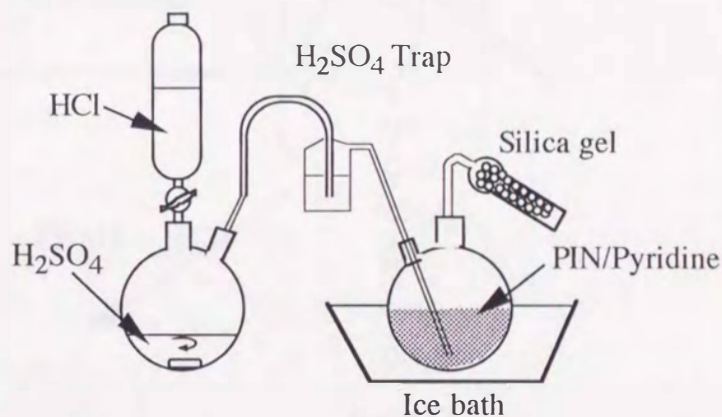
Fig. 2-11 Schematic diagram of the fiber-optic sensing system. A, Hg lamp; B, light chopper ; C, glass filter; D, monochromator; E, fiber positioner; F, optical fiber; G, sample cell; H, glass filter; I, photomultiplier; J, lock-in amplifier; K, recorder.



Scheme 2-3 Synthesis of FHMP

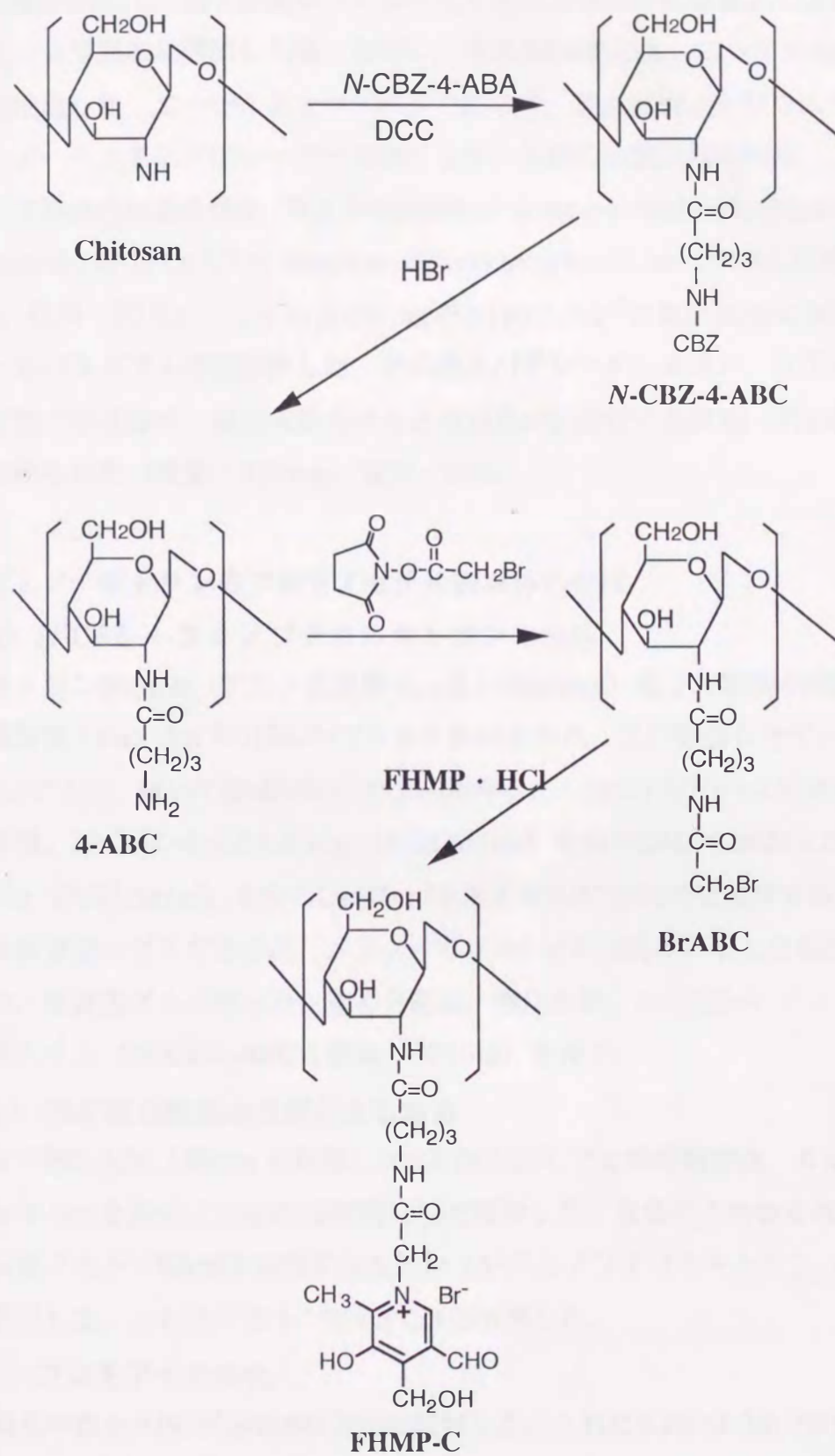
2.2.2.1 5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-2-メチル ピリジンの合成

塩酸ピリドキシリン10.0gをアセトン150ml中に加え500ml丸底フラスコに入れた。これを、氷水で20分間冷却した後、懸濁状態のまま右図の装置を用いて、HClガスを激しく50分間通気すると溶液は淡黄色に変化した。次



に、HClの通気を止めて反応容器を密栓した後、室温で75分間振とうして反応を完了した。反応液をそのまま一昼夜冷蔵保存後、冷却したままエーテル50mlを加えると白色結晶が析出した。これを濾別しエーテルで洗浄して白色結晶 ((3,3,5-trimethyl-6-aza-4-oxaisochroman-8-yl)methan-1-ol hydrochloride (α 4,3-O-isopropylidene pyridoxol hydrochloride; iso-PPOL·HCl) 収量: 10.4g, 収率: 87%) を得た。この結晶10gを水50mlに溶解し、 1 mol dm^{-3} NaOH水溶液約43mlで中和すると結晶が析出した。これを水20mlで4回洗浄し乾燥した (iso-PPOL; 収量: 8.31g)。

200ml丸底フラスコに乾燥ピリジン20mlを入れ、これにCrO₃1.36gを少量



Scheme 2-4 Modification of chitosan with FHMP

ずつ約40分間かけて添加溶解した。その間ピリジン溶液は20℃以下に保ち、スターラーで激しく攪拌した。これに、上記の中和後の結晶を2g含むピリジン溶液を加えて、約2時間かけてゆっくりとリフラス温度まで上げた。さらに、2時間加熱環流した後、冷却し、冷水40mlを加え、エーテル100mlで5回抽出した。エーテル相を水500mlで洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。エーテルをエバポレーターで除くとタール状の物質が得られた。これを昇華して淡黄色結晶を得た (3,3,5-trimethyl-6-aza-4-oxaisochromane-8-carboaldehyde ($\alpha^4,3$ -O-isopropylidene pyridoxal; iso-PPAL) 収量: 598 mg, 収率: 30%)。この結晶400mgを0.1 mol dm⁻³の塩酸20mlに溶解し、スチームバス上で1時間加熱した。その後エバポレーターを用い、50℃に加熱した状態で水を除き、減圧乾燥させると淡黄色のFHMPの塩酸塩 (FHMP · HCl) が得られた (収量: 375mg, 収率: 95%)。

2.2.2.2 キトサンのプロモアセチル誘導体の合成

(a) *N*-CBZ-4-アミノブチリルキトサンの合成

キトサン300mg (アミノ基換算モル数1.86mmol) を2%酢酸水溶液50mlに溶解後1 mol dm⁻³のNaOHでゲルを析出させた。この膨潤したゲルを水40mlで3回、続いてDMF20mlで2回洗浄した。次にDMF 6 mlを加え24時間攪拌後、*N*-CBZ-4-ABA 2.21g (9.32 mmol) を含むDMF 6 mlおよびDCC 1.92g (9.32 mmol) を含むDMF6mlを加えて40℃で24時間攪拌すると白色沈殿と淡黄色のゲルが生じた。メタノール40mlで6回洗浄すると白色沈殿が除かれ、淡黄色ゲルが残った。遠心分離後、減圧乾燥し*N*-CBZ-4-アミノブチリルキトサン (*N*-CBZ-ABC; 収量: 537mg) を得た。

(b) CBZ 基の酸加水分解による除去

N-CBZ-ABC 199mg に酢酸1.5mlを加え25℃で2時間攪拌後、6 mol dm⁻³ HBr 1.3mlを加えてさらに15時間30℃で攪拌した。微量の不溶物を遠心分離で除去後アセトン20mlを添加するとゲル (4-アミノブチリルキトサン, 4-ABC) が析出した。これをアセトン20mlで3回洗浄した。

(c) プロモアセチル化

得られた4-ABCゲルを水0.7mlに溶解した。これに0.1 mol dm⁻³のNaOH約

7 mlを加えてpH8.5にした。これに DMF 2 mlを加えた (A 液)。一方, N-ヒドロキシスクシンイミド1.83g (15.9mmol) を含むジオキサン溶液20mlとブROMO酢酸1.82g (13.1 mmol) を含むジオキサン10mlおよびDCC3.0g (14.5 mmol) を含むジオキサン溶液10mlを混合し, 60分攪拌した。生じた白色沈殿をフィルター (G-4) でろ過して得られた活性エステル溶液を先のA 液に加え, 4°Cで24時間攪拌した。析出ゲルをジオキサン20mlで2回洗浄してブROMOアセチル-4-ABC (BrABC) を得た。

2.2.2.3 5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジンでの修飾

BrABCにDMSO 1mlを加え攪拌し, 膨潤懸濁状態とした。これに先に合成したFHMP・HCl 164mg (0.81 mmol) を含むDMSO 2 mlを加え50°C, 24時間遮光状態で攪拌した。その後ゲルが完全には溶解していなかったため, 遠心分離し, 下層固体 (収量110mg) と上澄みに分けた。上澄みにアセトン約35mlを加えるとゲルが析出した。遠心分離後アセトン20mlで2回洗浄しFHMP修飾キトサン (FHMP-C; 収量: 51.6mg) を得た。

2.2.3 プロブの作製と蛍光測定

Fig. 2-12のように外径 1 mmの光ファイバと, 外径0.5mmの光ファイバ2本をテフロンチューブで接続し, その外側をステンレスチューブで保護した。外径 1 mmの光ファイバの先端部にはガラス管 (1 mm i.d. x 0.5 mm) を熱収縮チューブで固定した。

アガロース15mgを水0.5mlに加熱溶解した。これにFHMP-C 2 mgを溶解した水0.2mlを添加し, 60°Cに保った。この溶液にFig. 2-12に示した光ファイバ先端部を浸漬, 直ちに引き上げ冷却固化させた。このFHMP-C/アガロース

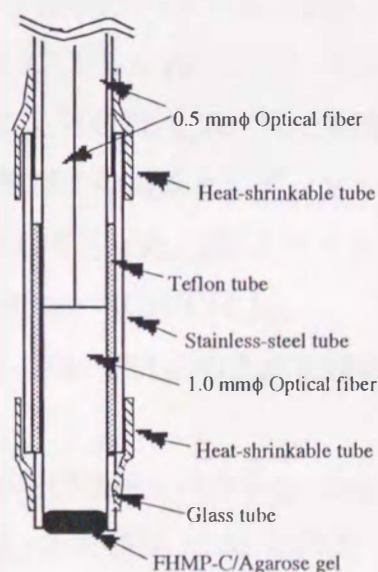


Fig. 2-12 Construction of the probe

膜の厚さは約0.5mmであった。

作製したセンサプローブを、10mlの検液を入れたバッチ型セルにセットし (Fig. 2-11) , マイクロシリンジで順次金属イオンを添加していく方法でセンサの応答を見た。また、センサプローブを再生するときは0.01mol dm⁻³ EDTA溶液に3分、続いて水に10分間浸漬した。

2.2.4 結果と考察

2.2.4.1 5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-2-メチル

ピリジンの同定

塩酸ピリドキシンとアセトンの反応から得られた化合物の¹H NMRスペクトル (Fig. 2-13) は、高磁場側より $\delta = 1.71(6H, s, -(CH_3)_2)$, $2.68(3H, s, Ar-CH_3)$, $4.74(2H, s, Ar-CH_2-OH)$, $5.20(2H, s, Ar-CH_2-O-)$, $8.21(1H, s, Ar-H)$ と帰属される。また、5'-ヒドロキシメチル基のメチレンプロトンは $\delta = 4.74$ のHDOシグナルに重なっていることがFig. 2-14との比較で示唆された。融点は209~213°C (文献値209~211°C)²⁶⁾であった。以上より、ピリドキシンの3位ヒドロキシ基と4'位ヒドロキシ基間で環状のケタールを形成しているiso-PPOL・HClの生成を確認した。

iso-PPOL・HClを中和して得られた化合物の¹H NMRスペクトル (Fig. 2-14)は、高磁場側より $\delta = 1.59(6H, s, -(CH_3)_2)$, $2.39(3H, s, Ar-CH_3)$, $4.51(2H, s, Ar-CH_2-OH)$, $4.91(2H, s, Ar-CH_2-O-)$, $7.75(1H, s, Ar-H)$ と帰属され、ピリジン窒素の脱プロトン化による電子吸引力減少の結果として、全シグナルの高磁場シフトが見られた。融点は103~106°Cであった。IRスペクトル (Fig. 2-15, KBr法) は、 $1146\text{cm}^{-1}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, $1380\text{cm}^{-1}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$, 1612cm^{-1} (ピリジン骨格)に吸収を示した。以上よりiso-PPOLの生成を確認した。

iso-PPOLをクロム酸酸化して得られた化合物の¹H NMRスペクトル (Fig. 2-16) は、高磁場側より $\delta = 1.50(6H, s, -(CH_3)_2)$, $2.45(3H, s, Ar-CH_3)$, $5.12(2H, s, Ar-CH_2-OH)$, $4.91(2H, s, Ar-CH_2-O-)$, $8.43(1H, s, Ar-H)$ および、新たに出現した $10.02(1H, s, Ar-CHO)$ と帰属された。融点は52~61°C (文献値59~60°C)²⁶⁾であった。IRスペクトル (Fig. 2-17, KBr法) は、

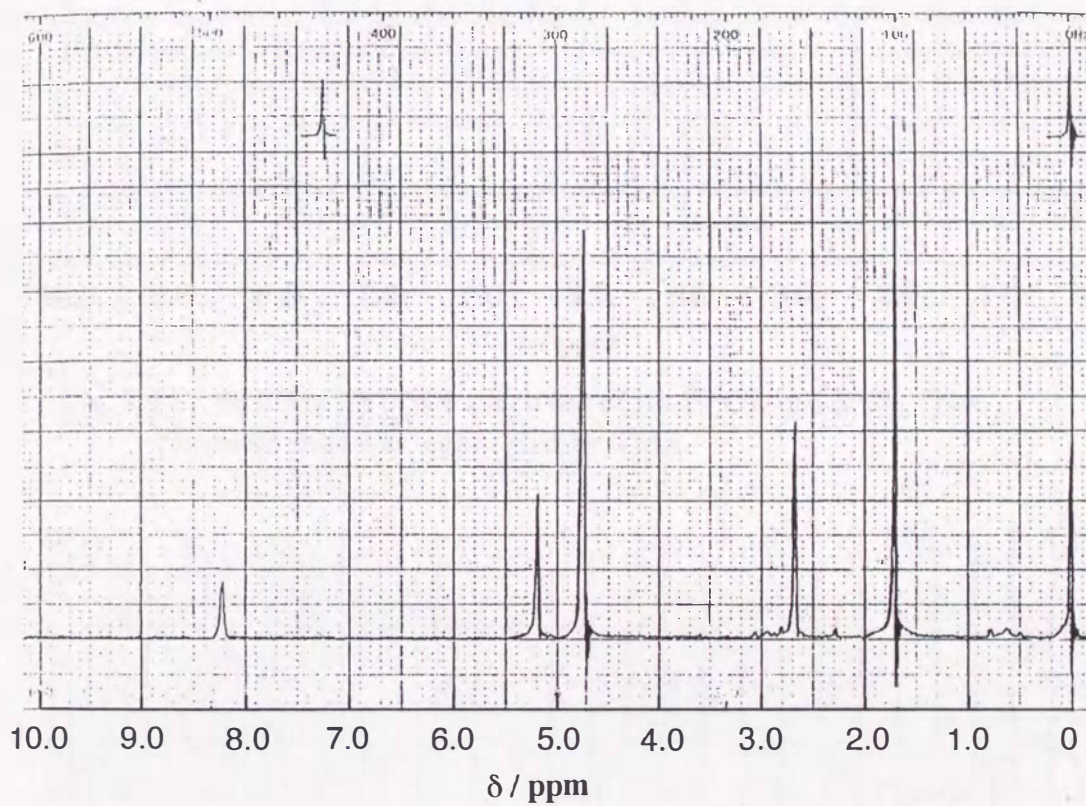


Fig. 2-13 60 MHz ^1H NMR spectrum of iso-PPOL · HCl in D_2O . The chemical shift was calibrated by DSS.

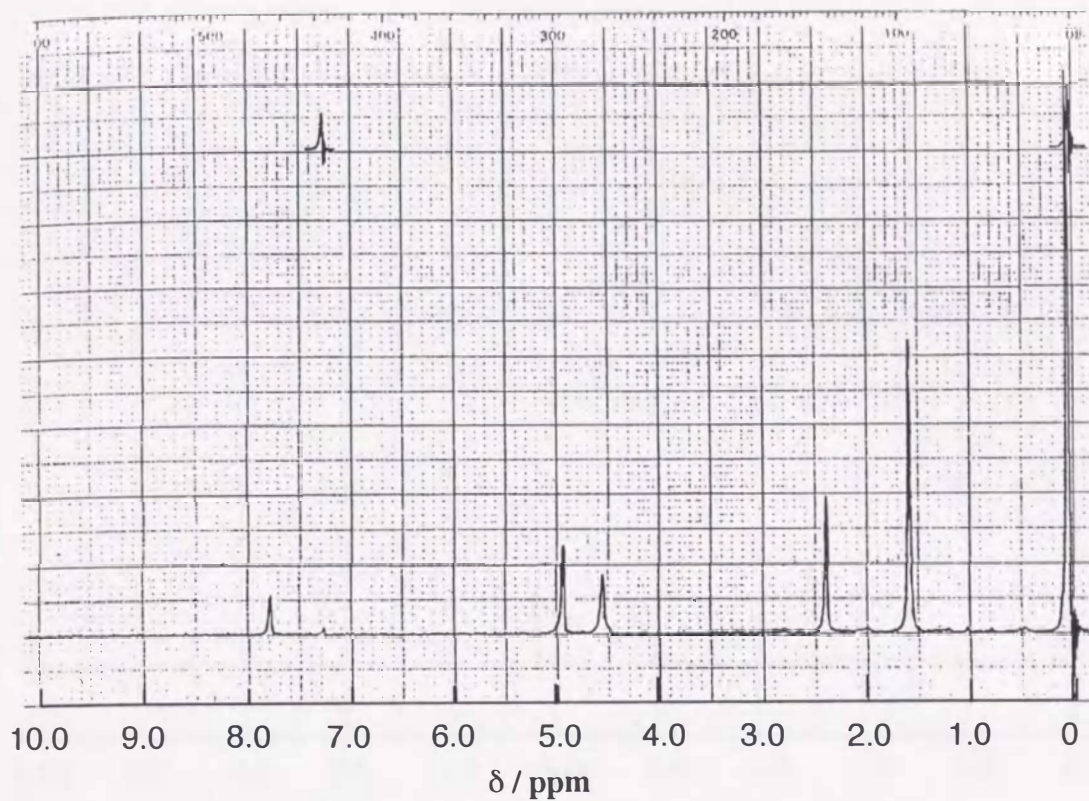


Fig. 2-14 60 MHz ^1H NMR spectrum of iso-PPOL in CDCl_3 . The chemical shift was calibrated by TMS.

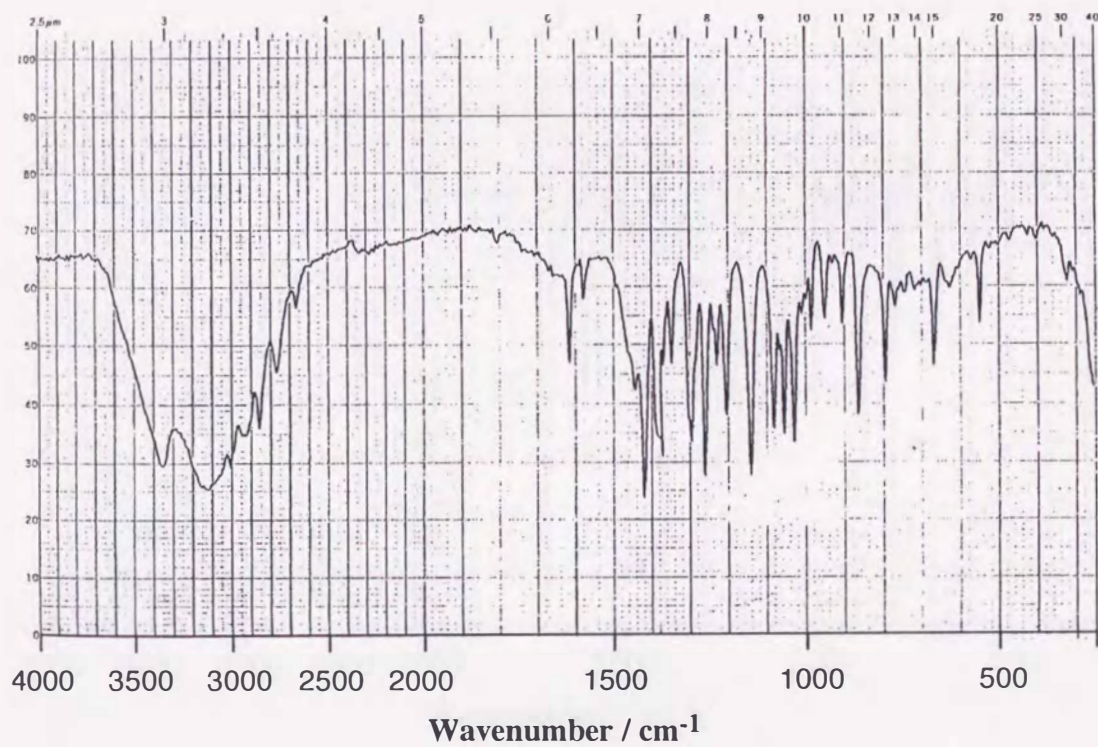


Fig. 2-15 IR spectrum of iso-PPOL.

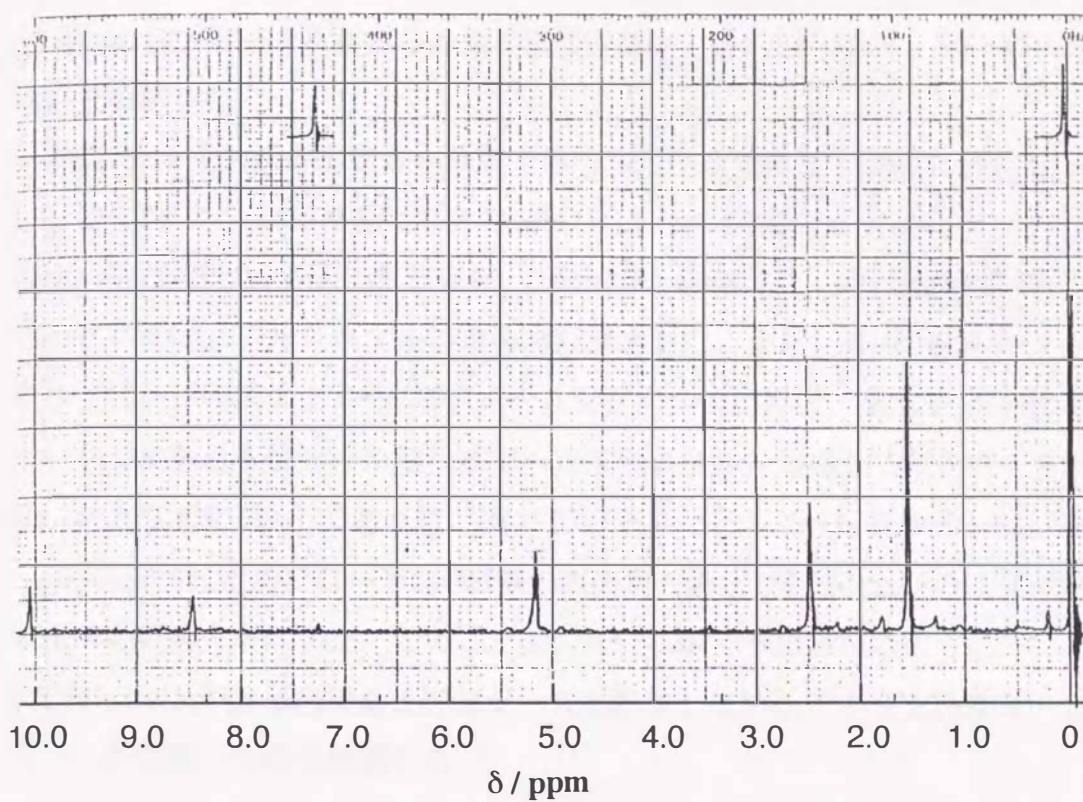


Fig. 2-16 60 MHz ^1H NMR spectrum of iso-PPAL in CDCl_3 . The chemical shift was calibrated by TMS.

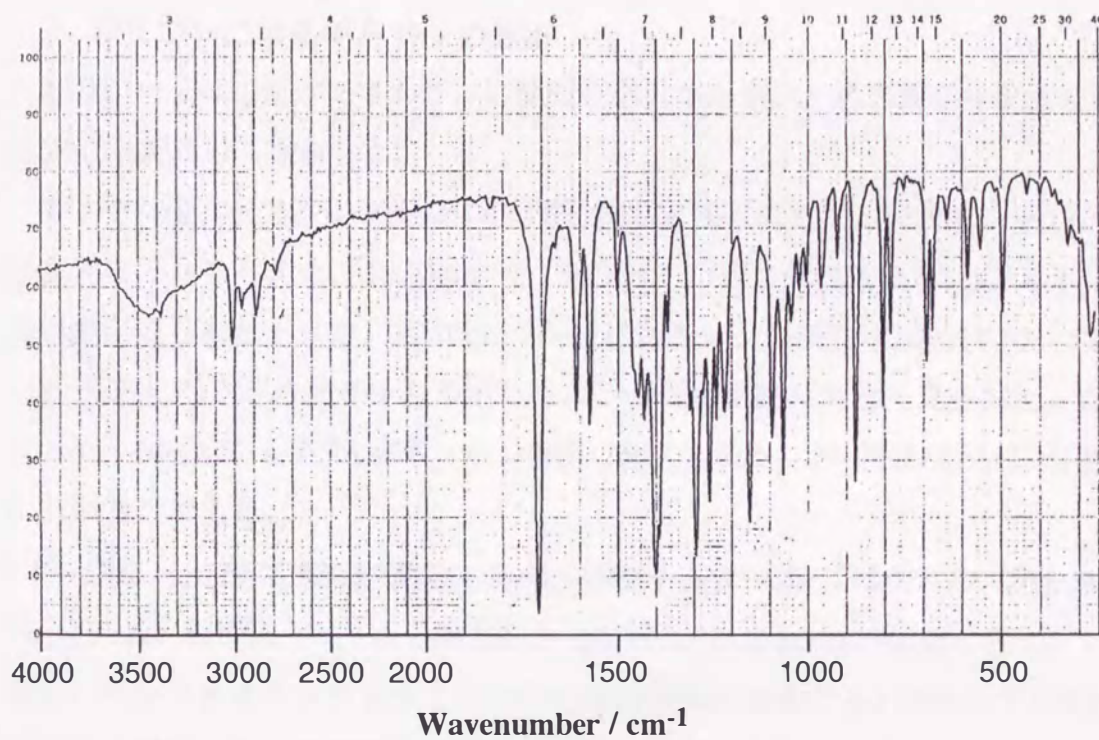


Fig. 2-17 IR spectrum of iso-PPAL.

OH基に由来する 3500cm^{-1} 付近のブロードな吸収の減少, および新たに 1706cm^{-1} にCHOカルボニルの強い吸収が出現した. 以上より, iso-PPALの生成を確認した.

最後にiso-PPALの塩酸加水分解で得られた化合物の ^1H NMRスペクトル (Fig. 2-18) は, 高磁場側より $\delta=2.65(3\text{H}, \text{s}, \text{Ar}-\text{CH}_3)$, $5.32(2\text{H}, \text{s}, \text{Ar}-\text{CH}_2-\text{OH})$, $6.71(2\text{H}, \text{s}, \text{CH})$, $8.31(1\text{H}, \text{s}, \text{Ar}-\text{H})$ と帰属され, $\delta=1.50$ 付近のイソプロピル基のメチルシグナルの消失が観測された. また, $\delta=10$ 付近のフォルミルプロトンの消失と $\delta=6.71$ のメチンシグナルの出現は, 重水中で4'位のヒドロキシル基と5位フォルミル基でヘミアセタールを形成してると考えられる. 融点は 300°C 以上であった. IR スペクトル (Fig. 2-19, KBr法) は, $3000\sim 3500\text{cm}^{-1}$ 付近のブロードなOH基の再出現, および 1706cm^{-1} のCHOカルボニルの吸収消失を示した. このことは, ^1H NMRで予想されたように, FHMP-HCl が分子内でヘミアセタールを形成していることを支持する. 以上より, 目的物の生成を確認した.

2.2.4.2 5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-2-メチル ピリジンによるキトサンの修飾

Scheme 2-4に従ってキトサンに側鎖を導入する場合, 各段階の中間生成物は主にIRを用いて検討した.

キトサンをN-CBZ-4-ABAとDCCで処理して得られたゲルはFig. 2-20(b)のIRスペクトルを与えた. 1670cm^{-1} と 1545cm^{-1} にそれぞれアミドIとアミドIIの吸収帯が見られた. また, 2940cm^{-1} 付近にメチレンの吸収増加と $1720\sim 1740\text{cm}^{-1}$ 付近にベンジルオキシカルボニルのC=O伸縮振動が大きく見られた. これより, N-CBZ-4-ABAがキトサン骨格に導入された, N-CBZ-4-ABCが生成していると考えた.

N-CBZ-4-ABCを脱CBZ処理して得られた4-ABCのIRスペクトル (Fig. 2-21(a)) はアミドIとアミドIIの吸収帯が 1660cm^{-1} と 1550cm^{-1} 付近に残っているが, ベンジルオキシカルボニルのC=O伸縮振動に由来する 1740cm^{-1} の吸収が大きく減少した. このことは脱CBZが起こっていることを示す.

次に, ブロモアセチル化後のIRスペクトル (Fig. 2-21(b)) は 1660cm^{-1} と

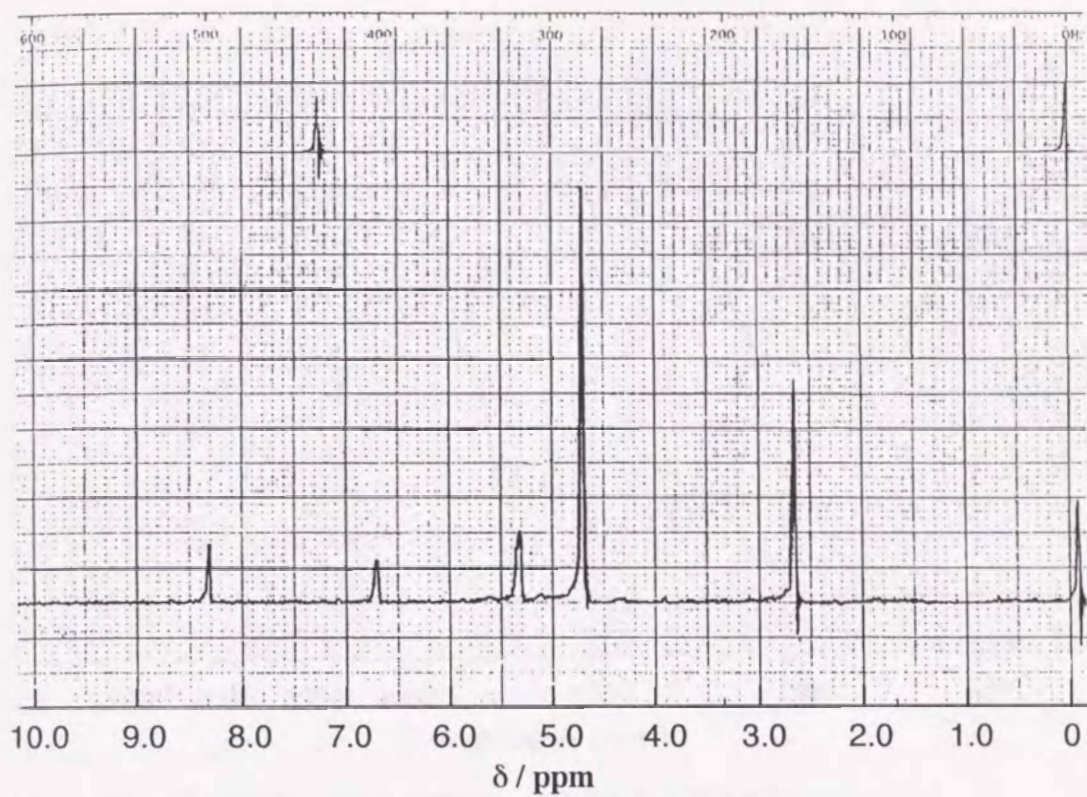


Fig. 2-18 60 MHz ¹H NMR spectrum of FHMP · HCl in D₂O. The chemical shift was calibrated by DSS.

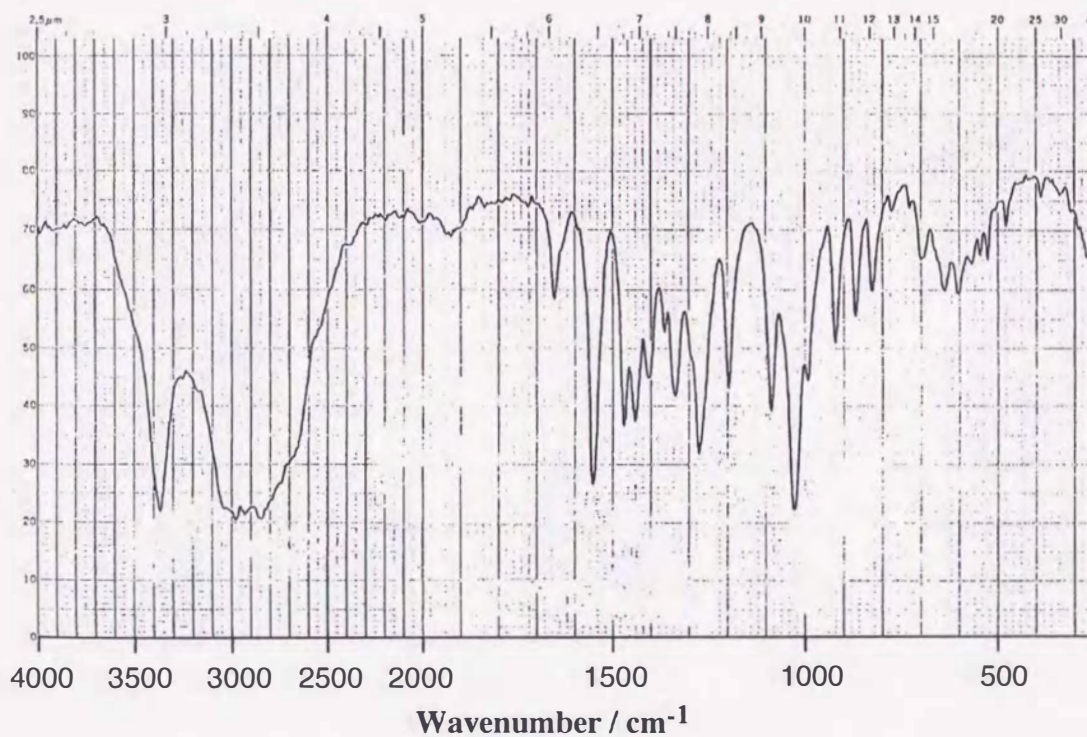


Fig. 2-19 IR spectrum of FHMP · HCl.

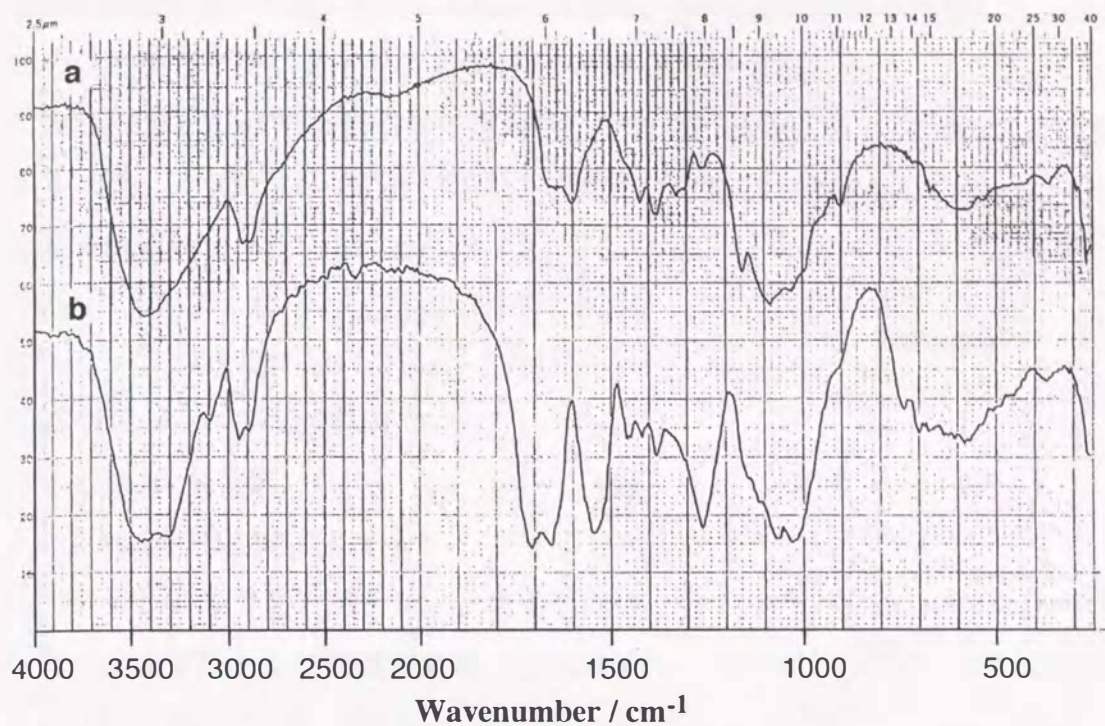


Fig. 2-20 IR spectra of (a) chitosan and (b) *N*-CBZ-ABC.

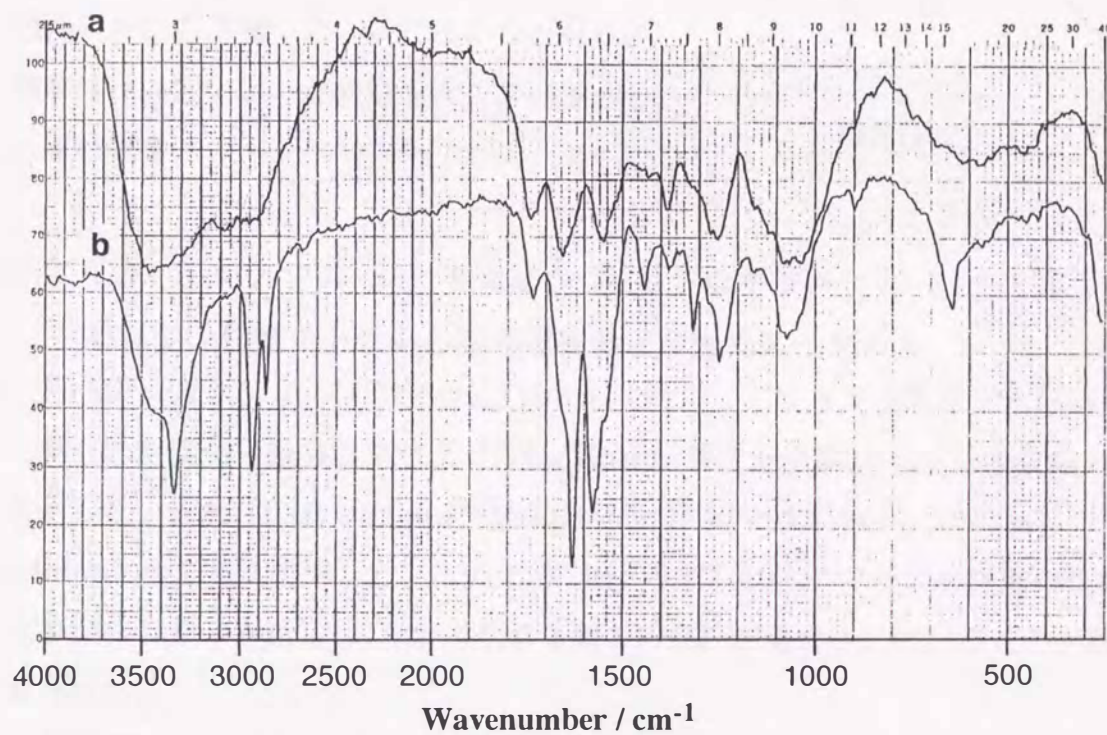
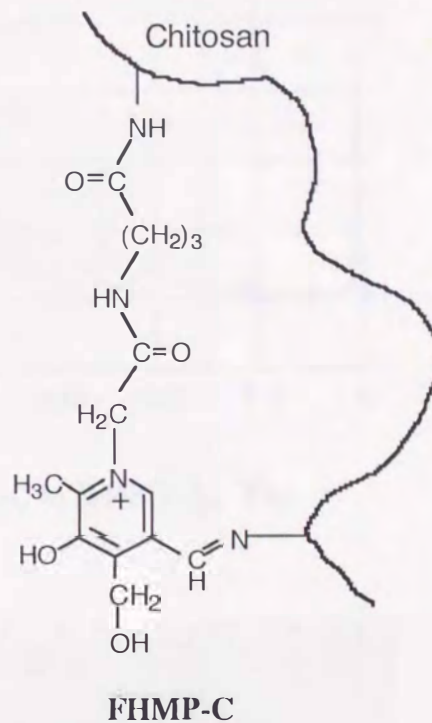


Fig. 2-21 IR spectra of (a) 4-ABC and (b) BrABC.

1550 cm^{-1} の吸収に重なって1630 cm^{-1} と1580 cm^{-1} に新たなアミドIおよびアミドIIの吸収が見られた。また、640 cm^{-1} にはC-Brの伸縮振動も出現した。これらのことから、ブromoアセチル化が進行したものと判断した。

BrABCにFHMPを反応させて得られたゲル (FHMP-C) の ^1H NMRスペクトル (Fig. 2-22) は、高分子の試料を60MHzの装置で測定しているため十分な解析を期待できないが、 $\delta=2.65$ (3H, s, - CH_3), 4.10 (2H, s, = $\text{N}^+-\text{CH}_2\text{CONH}-$), 5.24 (2H, s, - CH_2OH), 7.38 (1H, s, - $\text{CH}=\text{N}-$), 8.43 (1H, s, Ar-H)に構造から予想されるシグナルが見られた。ここで、 $\delta=7.38$ のシグナルは原料のFHMPに見られないシグナルであり、キトサンのアミノ基とシッフ塩基を形成したイミンプロトンに帰属できる。IRスペクトル (Fig. 2-23) は、1664 cm^{-1} と1552 cm^{-1} のアミドI, IIの吸収および1645 cm^{-1} にC=N-と思われる吸収を示し、これもシッフ塩基の存在を示唆した。これらのことから本修飾体は右図のような構造を有しているものと思われる。



2.2.4.3 5-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-2-メチル ピリジン修飾キトサンの紫外可視および蛍光スペクトル

FHMP-Cを0.01 mol dm^{-3} HCl/MeOHに溶解してシッフ塩基を加水分解して得られた紫外可視吸収スペクトルはFHMPの場合と同様294nmに吸収極大を示した。また、0.01 mol dm^{-3} NaOH/MeOH中では333nm, 256nm, 230nmの吸収極大を示した。0.01 mol dm^{-3} HCl/MeOH中での吸光度の比較よりグルコサミン約7ユニットあたり1個のFHMPが置換されていることが計算された。

FHMP-Cのメタノール溶液に亜鉛イオンを添加したときの蛍光スペクトルの変化をFig. 2-24に示す。励起波長365nmで410nm付近の蛍光が見られ、そ

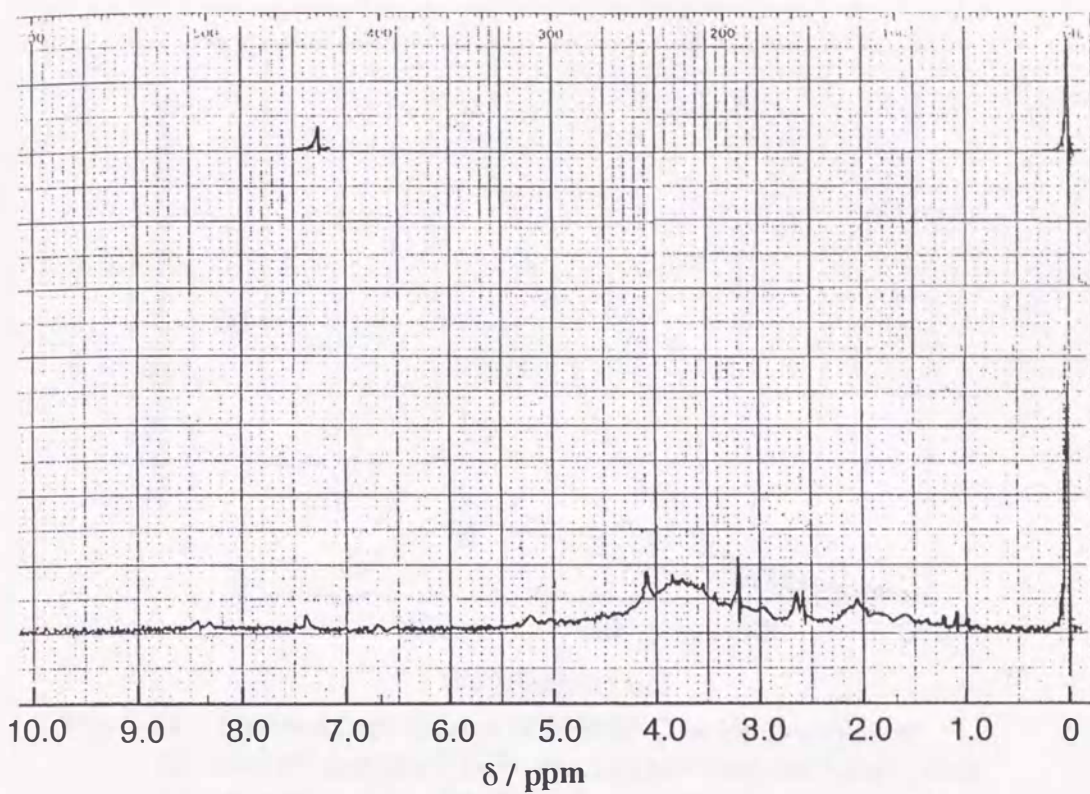


Fig. 2-22 60 MHz ^1H NMR spectrum of FHMP-C in DMSO-d_6 . The chemical shift was calibrated by TMS.

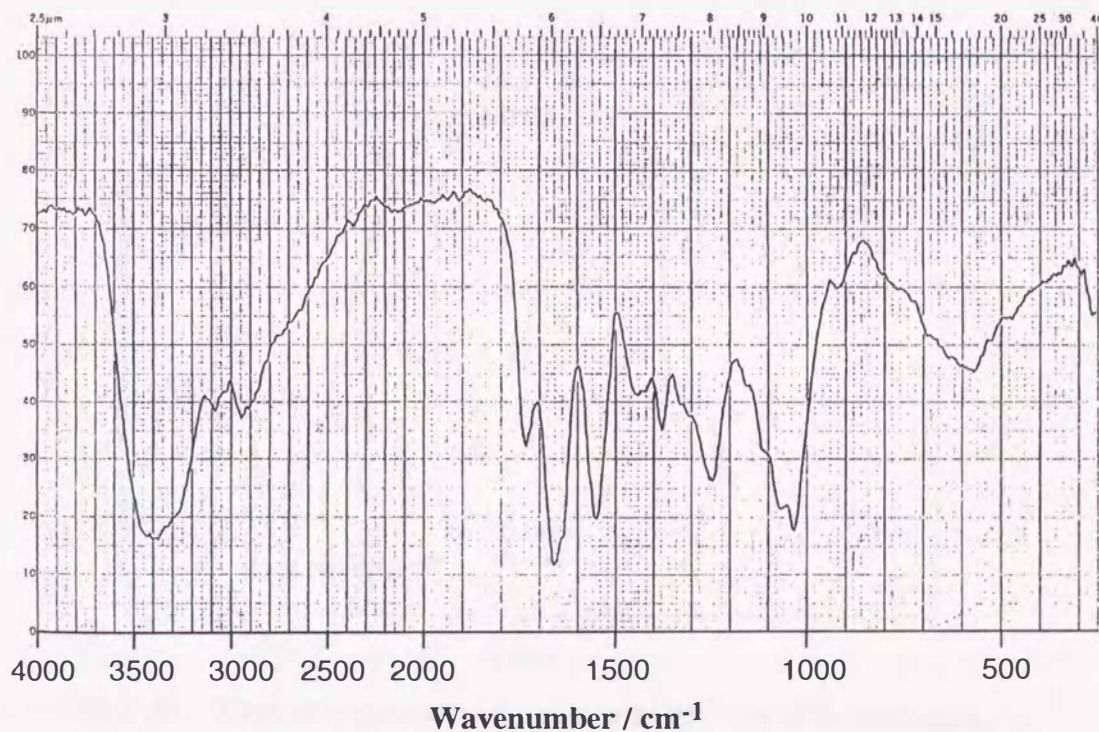


Fig. 2-23 IR spectrum of FHMP-C.

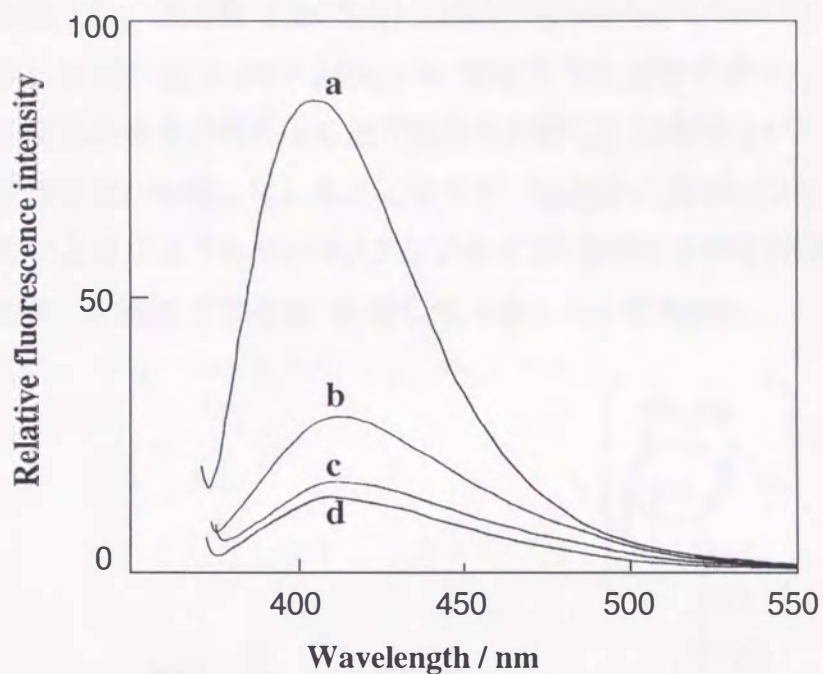


Fig. 2-24 Fluorescence spectra of FHMP-C in the presence of (a) $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Zn}^{2+}$, (b) $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Zn}^{2+}$, and (c) $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Zn}^{2+}$, and (d) in the absence of Zn^{2+} in methanol. The concentration of FHMP-C: $0.1 \text{ mg} / 5 \text{ ml MeOH}$; excitation wavelength: 365 nm .

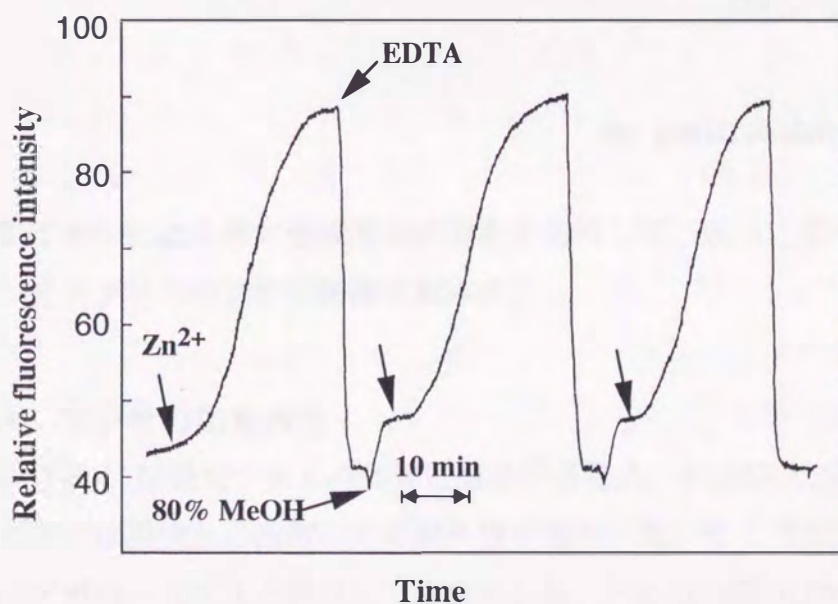
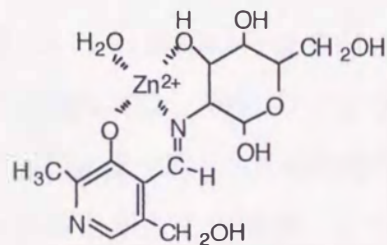
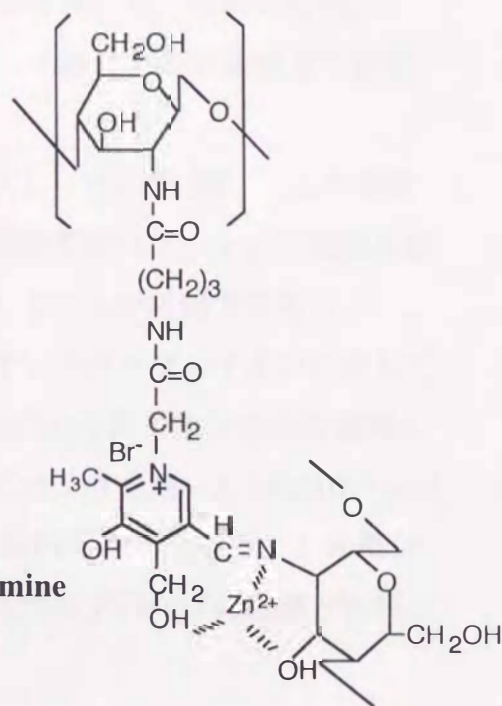


Fig. 2-25 Typical response of the sensor to Zn^{2+} in 80% methanol. The concentrations of Zn^{2+} and $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$ were $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ and $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, respectively.

の強度は亜鉛イオン濃度の増加にしたがって増加した。この蛍光は水/MeOH混合液では低下し、また酸 ($[\text{HClO}_4]=1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} / \text{MeOH}$) やアルカリ ($[\text{KOH}]=1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} / \text{MeOH}$) 存在下でも大きく減少した。これらは、シッフ塩基の加水分解による蛍光減少を示唆し、蛍光発光がシッフ塩基亜鉛キレート生成に起因していることを示す。蛍光性の錯体はおそらく、前田らの報告²⁰⁾によるピリドキサル/グルコサミン/亜鉛キレート錯体の構造 (下図 a) に類似した構造 (下図 b) を有しているものと思われる。



(a) Zn(II) chelate of *N*-pyridoxalidene glucosamine



(b) Zn(II) chelate of FHMP-C

この亜鉛イオンによる蛍光強度増加の現象を利用して、以下に述べるような亜鉛イオン光ファイバセンサの構築を試みた。

2.2.4.4 センサの応答特性

FHMP-Cを二股型光ファイバ先端に固定する場合、FHMP-C自身を風乾製膜しただけでは検液への溶解のため耐久性が悪かった。そこで2.2.3項で述べたようにアガロースゲルと混合して固定化した。Fig. 2-25に $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ の亜鉛イオンに対する80%メタノール中での繰り返し応答図を示す。センサはバッチ型セル中の10mlの検液に浸し亜鉛イオンを添加すると約15分で

一定値を示した。次に 0.1 mol dm^{-3} の EDTA 水溶液を 1 ml 添加すると蛍光強度は 1 分以内に消失した。ピリドキサルおよび芳香族アルデヒドとアミノ糖やアミノ酸シッフ塩基は亜鉛キレートを形成すると強い蛍光を発することが知られており、蛍光の消失は EDTA による亜鉛イオンの捕捉がシッフ塩基キレートの解離を引き起こしていることを示唆する。繰り返し使用する場合、EDTA 処理したセンサプローブを別容器に入れた水中に 10 分浸漬洗浄後、次のサンプルは検液を入れ替えて再度測定を行った。8 回繰り返し再現誤差は 5% 以内であり 1 週間を通して 40 回測定後も初めの 90% の応答を示した。このことは、FHMP-C がアガロースマトリックス中に、おそらく多点での水素結合で安定に固定されていることを示している。

応答は検液の水の割合が増加すると大きく減少し (Fig. 2-26) , この挙動は均一溶液中の蛍光スペクトル測定時の結果と同様であった。シッフ塩基の加水分解が蛍光性キレート錯体の分解を引き起こしたことが原因であろう。

センサは他の金属イオン、特にカドミウムイオンとガリウムイオンに対しても応答を示した (Fig. 2-27) 。この場合 Fig. 2-25 の亜鉛イオンの応答速度よりもかなり速い応答を示しているが、これと同じセンサを用いた $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ の亜鉛に対する応答速度もほぼ同じく 1 分以内であったので、この場合膜厚が薄く調製されているものと思われ、応答速度はプローブの膜厚と試料の濃度に依存することを示唆する。

これら 3 種類のイオンに対する検量線を Fig. 2-28 に示す。亜鉛イオンに対して高い応答選択性を示し、 $0 \sim 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ の検量線は相関係数 0.994 の直線を示した。また、検出下限は $S/N = 3$ の時 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ であった。アルミニウムイオンに対する応答はガリウムイオンの約半分であったが、マグネシウムイオンはそのシッフ塩基キレート錯体の生成定数が低い²⁵⁾ ため、ほとんど応答を示さなかった。銅、ニッケルイオンに対しては全く応答を示さなかったが、これはおそらく、配位子内 $\pi-\pi^*$ 励起 1 重項状態のエネルギーが、 $d-d$ 励起状態か電荷移動励起状態へ無放射失活²⁷⁾ するためと考えられる。

ピリドキサルとアミノ糖のシッフ塩基の亜鉛キレートが高い蛍光性を示すには、アミノ基に隣接したヒドロキシル基が重要な役割を果たしていることが

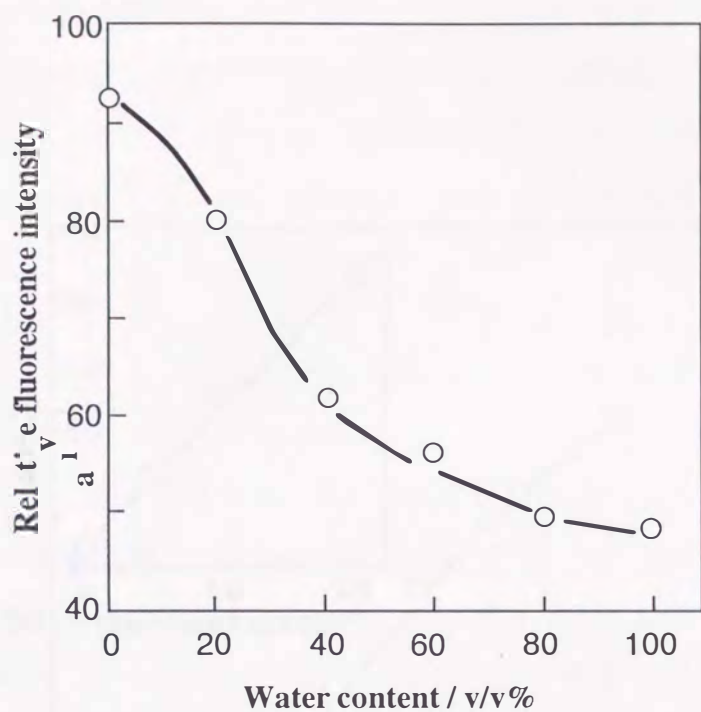


Fig. 2-26 Effect of the water content on the response. The concentration of Zn^{2+} was the same as that in Fig. 2-25.

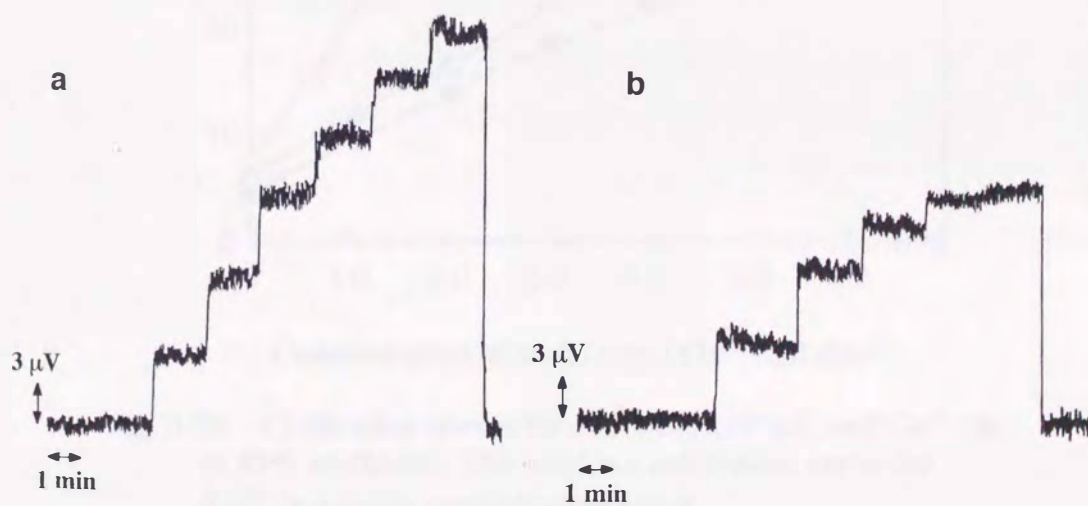


Fig. 2-27 Typical responses of the sensor upon successive introduction of (a) Cd^{2+} and (b) Ga^{3+} into the batch cell. One hundred μl of each 0.1 mol dm^{-3} metal ion was added to 10 ml of 80% aqueous MeOH.

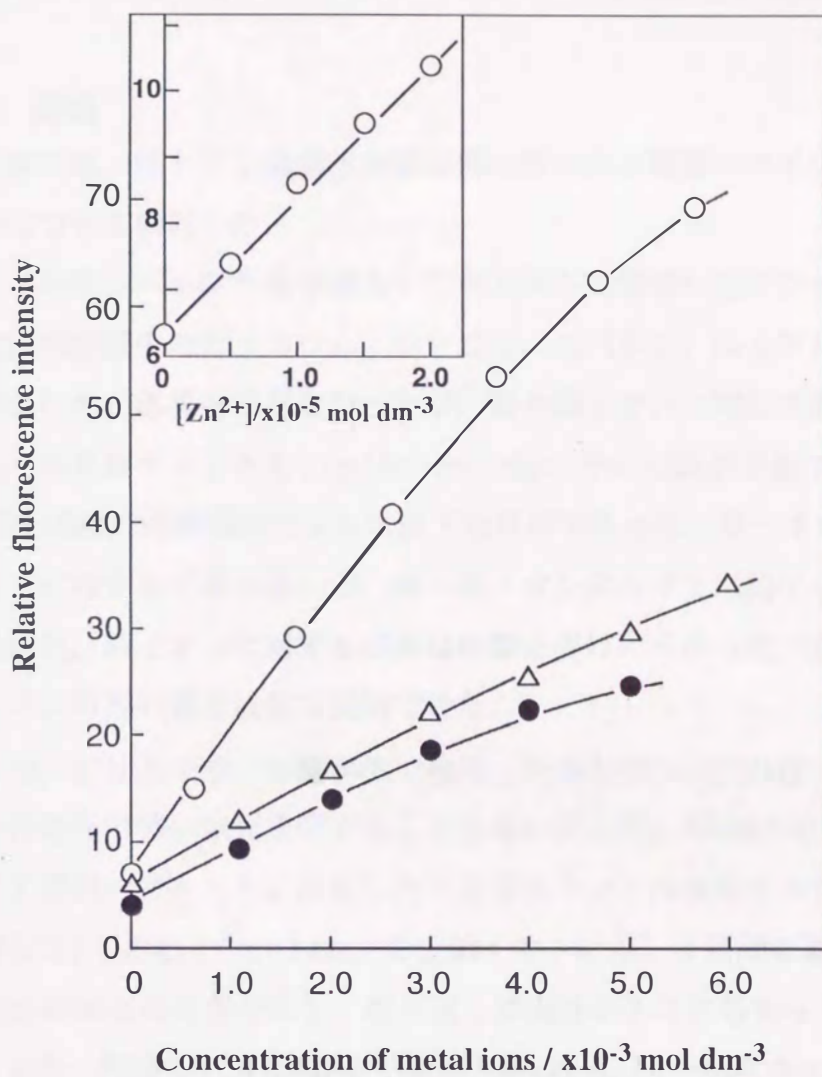


Fig. 2-28 Calibration curves for Zn²⁺(O), Cd²⁺(Δ) and Ga³⁺(\bullet) in 80% methanol. The inset is a calibration curve for Zn²⁺ in a lower concentration range.

指摘されている²⁰⁾。このことから、FHMP-Cのキトサン骨格のヒドロキシル基もキレート形成に関与して亜鉛キレートの発蛍光に重要な役割を果たしていることが予想される。ここでは示していないが、FHMP-C亜鉛キレートはFHMPとバリンで生成したシッフ塩基の亜鉛キレートよりも約4倍強い蛍光を示した。このこともキトサン骨格のヒドロキシル基の関与を裏付けている。

2.3 総括

本章では、キトサン誘導体を感応部に用いた2種類のタイプの金属イオンセンサについて検討した。

ヒドロキシベンジル基を導入したキトサンで修飾したグラッシーカーボン電極は、水溶液中のカドミウム、ウラニル、コバルト、ニッケルの各イオンに対してほとんど応答を示さなかったが、鉛と銅イオンに対して高い応答選択性を示し、両金属イオンとも $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ での定量が可能であった。応答再現性は10回の連続測定で $\pm 4\%$ 以下と良好であった。単一イオン存在下では鉛イオンに対する応答が高いが、銅・鉛イオン共存下では鉛イオンの応答の減少が見られ、銅イオンに対する応答は影響を受けにくかった。これらの挙動は、銅イオンの高い錯形成能で説明できた。

一方、ピリドキサル誘導体で修飾したキトサン (FHMP-C) は、亜鉛イオン存在下で強い蛍光を発することを見いだした。FHMP-Cを光ファイバ先端にアガロースとともに固定した二股型光ファイバ蛍光センサは、亜鉛イオンに対して、 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ の亜鉛イオンに対し1週間を通して40回測定後も初めの90%の応答を示し、繰り返し再現性のある応答を与えることが分かった。また、80% MeOH溶媒中で検出下限は $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (S/N=3)であり、FHMP-Cが亜鉛イオンの光ファイバ蛍光分析に利用できることが分かった。

以上のように、キトサンは化学修飾により、特定の金属イオンセンサの応答部位の材料として利用できる適切な性質を有していることが分かった。その性質を簡単にまとめると(1) グルコサミンの重合体のため、アミノ基をユニット毎に有し、高度に置換した修飾体が得られる。このことは、高濃縮・高感度化に寄与する。(2) その際、反応性の高いアミノ基を利用するため、配位子

部位の分子設計が比較的容易にできる。(3) キトサン骨格のヒドロキシル基の存在が錯体形成に有利に利用できる(4) 得られた修飾体は適当な溶媒に溶解した後それ自身でキャスト膜とするか、あるいは他のマトリックスと混合して安定に固定化できるためセンサ応答部位を構築しやすいことなどが挙げられる。

参考文献

- 1) R. A. A. Muzzarelli, O. Tubertini : *Talanta*, **16**, 1571 (1969).
- 2) L. D. Hall, M. Yalpani : *Carbohydr. Res.*, **83**, C5 (1980).
- 3) 井上勝利, 大渡啓介, 吉塚和治, 新原隆司, 喜納兼勇 : 分析化学 (Bunseki Kagaku) , **44**, 283 (1995).
- 4) K. Inoue, K. Ohto, K. Yosizuka, T. Yamaguchi : T. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 2443 (1997).
- 5) K. Ohga, Y. Kurauchi, H. Yanase : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 444 (1987).
- 6) S. V. Prabhu, R. P. Baldwin : *Anal. Chem.*, **59**, 1074 (1987).
- 7) S. -Z. Yao, X. -M. Chen, L. -H. Nie : *Mikrochim. Acta*, **1**, 299 (1990).
- 8) L. A. Saari, W. R. Seitz : *Anal. chem.*, **55**, 667 (1983).
- 9) O. Egorov, J. Ruzicka : *Analyst*, **120**, 1959 (1995).
- 10) W. H. Chan, A. W. M. Lee, C. M. Lee, K. W. Yau, K. Wang : *Analyst*, **120**, 1963 (1995).
- 11) W. H. Chan, A. W. M. Lee, D. W. J. Kwong, W. L. Tam, K-M. Wang : *Analyst*, **121**, 531 (1996).
- 12) J. E. Madden, T. J. Cardwell, R. W. Catrall, L. W. Deady : *Anal. Chim. Acta.*, **319**, 129 (1996).
- 13) I. Murkovic, I. Oehme, G. J. Mohr, T. Ferber, O. S. Wolfbeis : *Mikrochim. Acta*, **121**, 249 (1995).
- 14) 渡辺邦洋, 青木伊豆男 : 分析化学 (Bunseki Kagaku) , **35**, 1 (1986).
- 15) 渡辺邦洋, 青木伊豆男 : 分析化学 (Bunseki Kagaku) , **35**, 487 (1986).
- 16) R. M. Dagnall, R. Smith, T. S. West : *Talanta*, **13**, 609 (1966).
- 17) R. M. Dagnall, R. Smith, T. S. West : *Analyst*, **92**, 20 (1967).

- 18) F. Capitan, A. Navalon, J. L. Vilchez : *Anal. Lett.*, **23**, 1907 (1990).
- 19) 渡辺邦洋, 青木伊豆男 : 分析化学 (Bunseki Kagaku) , **34**, 497 (1985).
- 20) M.Maeda, T. Kinoshita, A Tsuji : *Anal. Biochem.*, **38**, 121 (1970).
- 21) R. B. Thompson, E. R. Jones : *Anal. Chem.*, **65**, 730 (1993).
- 22) S. Hirano, N. Matsuda, O. Miura, H. Iwaki : *Carbohydr. Res.*, **71**, 339 (1979).
- 23) L. B. Wingard, Jr., J. L. Gurecka, Jr. : *J. Mol. Catal.*, **9**, 209 (1980).
- 24) D. L. Leussing, K. S. Bai : *Anal. Chem.*, **40**, 575 (1968).
- 25) D. Hopgood, D. L. Leussing : *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3740 (1969).
- 26) R. J. Johanson, D. E. Metzler : "*Methods in Enzymology*", ed. D. B. McCormick, L. D. Wright, Vol.18, Part A, p.527 (1970), (Academic Press, New York) ; W. Korytnyk, E. J. Kris, R. P. Singh : *J. Org. Chem.*, **29**, 574 (1964).
- 27) K. Ohga, Y. Kurauchi : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 3269 (1987).

第3章 ピレン誘導体で修飾したキトサンを感応部とする 有機溶媒中微量水分測定用光ファイバ蛍光センサ

石油製品を含めた液状有機化合物中の不純物としての微量水分はその性質に大きく影響を与える。これらの製品の製造プロセス管理には、水分のオンライン分析が必要になり、有機溶媒中の水分測定およびその自動化は大きな課題となっている。

もっとも広く用いられている有機溶媒中の微量水分の定量は、カールフィッシャー滴定法¹⁾であろう。この方法を自動化しようとする場合、回分法に比べて感度が落ちる欠点がある。そのため従来より知られている四酢酸鉛²⁾、クロマズロール B³⁾、ジチゾン⁴⁾などの発色試薬を用いた分光光度法による定量法をフローインジェクション分析 (FA法) に応用し自動化を図った研究⁵⁾や検出部位にOH基に選択的な近赤外線を用いたFA法⁶⁾なども近年報告されている。また、さらに高い精度を必要とする場合の分析法として、従来よりガスクロマトグラフィーを用いた方法^{7,8,9)}が行われている。これら以外にも、ピリジニウムフェノレートベタイン色素のソルバトクロミズムを利用した方法¹⁰⁾やN,N-カルボニルジイミダゾールとの反応で発生した炭酸ガス量で水分の測定を行う方法¹¹⁾、ユーロピウム(III)の水和に起因する蛍光寿命の減少測定によるDMF、DMSO中の水分分析法¹²⁾など様々な方法が提唱されている。しかし、これらはいずれもサンプリングや反応に伴う分析手順の煩雑さのためリアルタイムな分析への利用が困難である欠点を有する。

一方、ナフィオン膜で覆われた電極を用いたパルス電解法¹³⁾は微量水分のオンライン分析への応用を目的として検討されている。また、我々は、近年PVC液膜中に固定したピレンカルボキシアリドの蛍光強度が少量の水によって変化することを利用して、リアルタイムなエタノール中の水分測定用光ファイバセンサ¹⁴⁾を作製しその特性について報告した。しかし、PVC液膜への水分取り込み量の制限やピレン誘導体の漏出などの問題があり、センサとして十分な性能を有していなかった。

本章ではキトサン骨格にピレンカルボキシアリド部位を共有結合で導入した修飾体の合成と、有機溶媒中のリアルタイムな水分定量用光ファイバセン

サの作製手順および応答特性について述べる。感応部膜材料としてキトサンを用いたのは、水に対する高い濃縮効果を期待したためである。この水への高い親和性は、キトサン膜およびその架橋膜の水に対する選択的透過を可能にし、この性質を利用して、バイオ発酵で得られる低濃度のエタノールの分離濃縮膜への利用^{15,16)}も試みられている。一方、疎水的または親水的なマイクロ環境がピレン類の蛍光強度の増減をもたらすことが期待され、この現象をセンサに応用しようとするものである。さらに、ピレンカルボキシアルデヒドをキトサン膜に導入した場合、キトサンの残存アミノ基とシッフ塩基を形成することが予想され、水の存在によって引き起こされるであろう可逆的なシッフ塩基の解離平衡による蛍光強度変化が加わり、より高感度のセンサが期待される。

3.1 実験

3.1.1 試薬および装置

キトサンは加ト吉製の95%脱アセチル化したものをそのまま用いた。1-ピレンブタン酸(1-PBA)、N-メチルフォルムアニリドはアルドリッチ社より、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシランは信越化学より、また1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(WSC)は同仁化学研究所から購入した。O-ジクロロベンゼンは和光化学用を金属ナトリウム存在下、またDMFとDMSOは和光特級品を水素化カルシウム存在下いずれもアルゴン雰囲気中で減圧蒸留した。測定溶媒に用いた乾燥エタノールは水素化カルシウム存在下、アセトニトリルは五酸化ニリン存在下3時間還流後にそれぞれ単蒸留し乾燥精製した。ベンゼンとヘキサンは、金属ナトリウム存在下单蒸留した。ケロシンは活性化モレキュラシーブで処理して乾燥した。その他の試薬は全て市販特級品を使用した。水はミリポア製逆浸透純粋製造装置Milli-RO15とヤマト製イオン交換装置WA-550を通したものをを用いた。IRスペクトルは日立製270-50型赤外分光光時計で得た、紫外可視吸収スペクトルは島津製UV-160型分光光度計を、NMRはブルカー製ARX 300を用いて測定した。

石英製光ファイバは第2章2.2.1と同じものをを用いた、二股型光ファイバ蛍光測定装置は第2章のFig. 2-11と同様な構成部分で成り立っている。ただし、励起光側フィルターには東芝製ガラスフィルターK1A3を、受光側には同

社製フィルターY47を用いた。また、光電子増倍管は浜松製C665を用いた。超高圧水銀灯を光源とした励起光はライトチョッパーにより交流に変調後、フィルター、モノクロメーターを通して365nm光のみを、二股型光ファイバーセンサの一端より導入しプローブ先端の応答膜中のピレン誘導体を励起した。プローブ先端はFig. 3-1

の回分式セル中に入れた10mlの有機溶媒中に浸漬し、一定濃度の水を含む試料をシリンジで順次注入添加した。セルの内部は測定対象とする有機溶媒の蒸気を飽和させたアルゴンガスを流し、大気中の水分の影響を除いた。先端プローブからの蛍光は、もう一方の光ファイバよりフィルターを通して光電子増倍管で検出、ロックインアンプで増幅した。

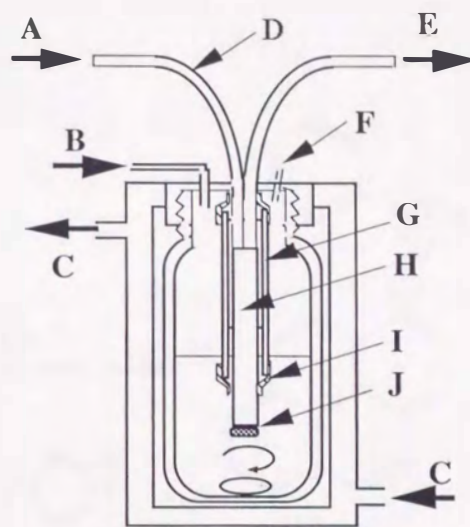
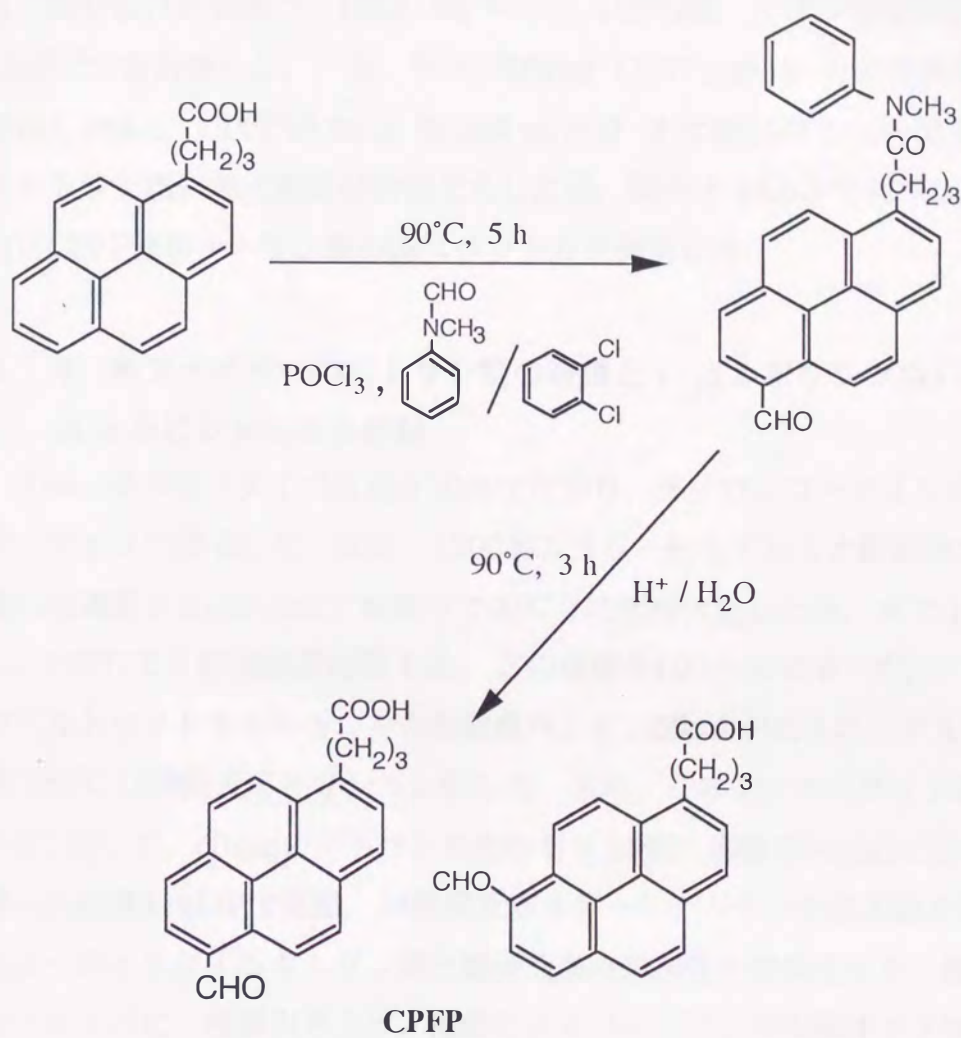


Fig. 3-1 Construction of the cell and the probe.
A, incident light; B, Ar gas; C, flow of the thermostated water; D, 0.5 mm ϕ quartz fiber; E, fluorescence; F, sample injection; G, stainless tube; H, 1 mm ϕ quartz fiber; I, heat-shrinkable tube; J, CPFP/chitosan membrane;

3.1.2 1-カルボキシプロピルフォルミルピレンの合成

Scheme 3-1¹⁷⁾ に従って合成した。1-PBA 1.2 g (4.2 mmol), *N*-メチルフォルムアニリド 2.0 ml (2.2g, 16 mmol), オキシ塩化リン 4.0 ml (6.6 g, 43 mmol) を1,2-ジクロロベンゼン 4 ml に混合溶解させ、アルゴン雰囲気下、90℃で5時間加熱反応させると黒褐色の液体が得られた。これを酢酸ナトリウム 10 g を含む水溶液 20 ml 中に注ぎ、水相を除去後、さらに 20 ml の水で有機相の洗浄を 2 回繰り返した。得られた有機相にはトルエン 15 ml を加えたあと、12N 塩酸 6 ml を加え 90℃ 3 時間攪拌し加水分解すると濃緑黄色の固体が析出した。これを濾別後クロロホルムで洗浄、乾燥した (収量 625 mg)。つづいて真空ポンプ減圧下 180℃ の油浴加熱による昇華装置を用いた蒸留操作により黄色固体を得た (収量 327 mg, 収率 18%)。さらにクロロホルムで再結晶し



Scheme 3-1 Synthesis of CPFP.

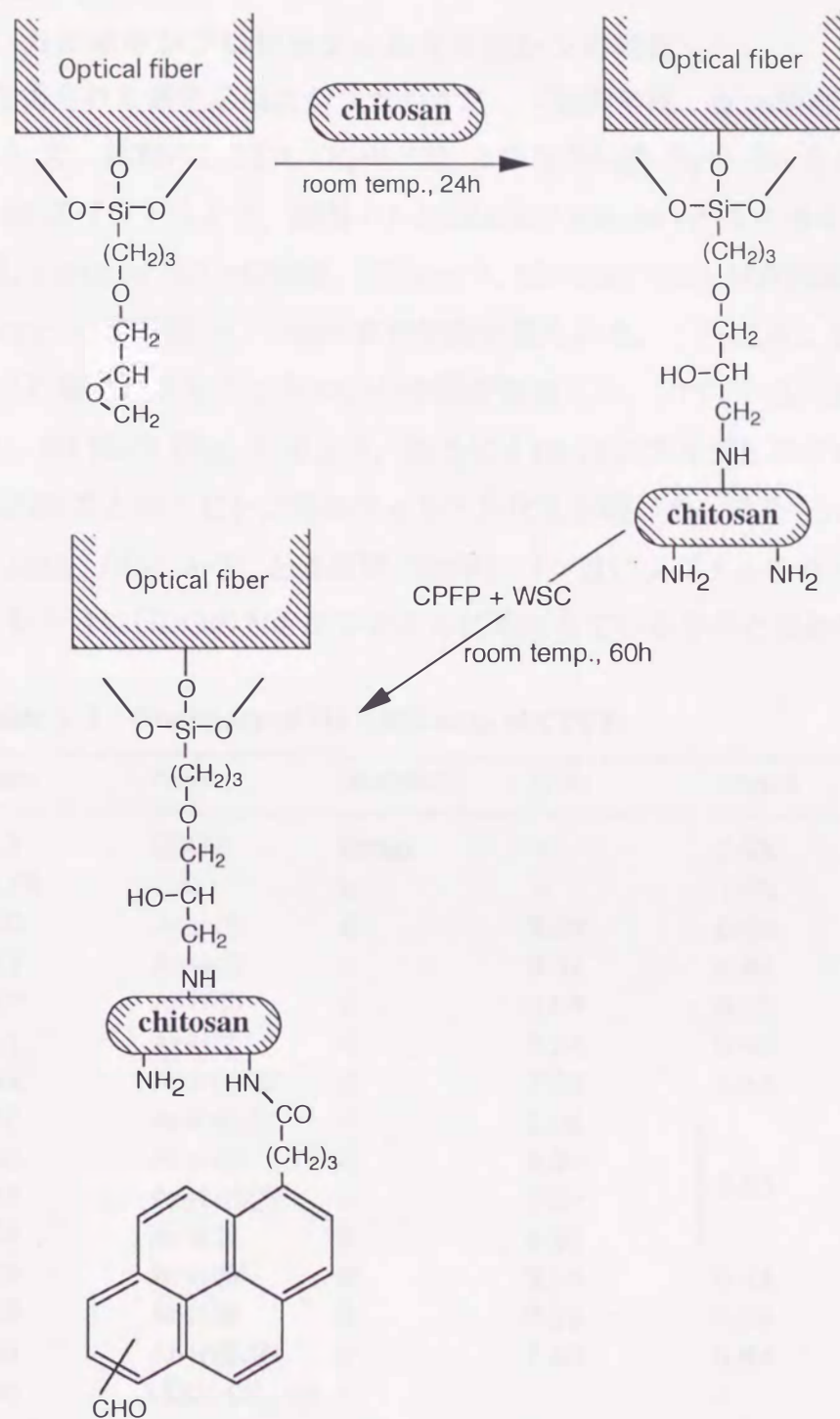
110 mg (収率8.3%, 融点173.0–177.0°C) の黄色結晶1-カルボキシプロピルフォルミルピレン (CPFP, 6-, 8-異性体の混合物) を得た.

3.1.3 1-カルボキシプロピルフォルミルピレン修飾キトサン膜の調製

キトサン25.5mg (グルコサミンユニットに換算して0.15 mmol) を2%酢酸水溶液0.5mlに溶解しテフロン板上にキャストして風乾製膜した. テフロン板に貼り付けた状態で, 1 mol dm^{-3} のNaOH水溶液, イオン交換水続いてDMFで十分洗浄した. 一方, WSC 300mg (1.57 mmol) を含む66%DMF水溶液1.5mlと, CPFP50.0mg (0.158 mmol) を含むDMF 2 mlを混合した溶液をキトサン膜に加え室温48時間反応した後, 膜を十分DMFで洗浄した. 得られたCPFP修飾キトサン膜のIRスペクトルを測定した.

3.1.4 光ファイバへのキトサン膜の被覆と1-カルボキシプロピルフォルミルピレンによる修飾

1 mm径の光ファイバを長さ30mmに切り, ナイロンコーティングをカッターナイフで除去した. 次に, 1200番エメリー紙とアルミナ研磨剤で鏡面研磨した端面を 2 mol dm^{-3} 塩酸中で90°C 2時間活性化した後, 水で十分洗浄し, 120°Cで3時間減圧乾燥した. この端面を10v/v%の3-グリシドキシプロピルトリメトキシシランを含む乾燥ベンゼン20ml 中に入れ, アルゴン雰囲気下85°C12時間反応させシラン化した. 次に, このファイバロッドをScheme 3-2に従って, 60mgのキトサンを含む2%酢酸水溶液をNaOHでpH5.5に調整した溶液4 ml 中で室温, 24時間反応させ一旦キトサンを共有結合して続いてコーティングするキトサン膜と電極表面の親和性を増加させた. 続いて, このファイバに, 浸漬引き上げ/風乾によるコーティングの操作を3回繰り返して, キトサンを製膜した. 得られたキトサン膜被覆ファイバを, 1 mol dm^{-3} NaOH水溶液に1時間浸漬後, 水洗浄し, WSC 60mg (0.31mmol) とCPFP10mg (0.031mmol) を含む66%DMF水溶液0.3ml中に入れ, 室温で60時間反応させた. その後40°Cインキュベーター中で24時間乾燥して得られたロッドをFig. 3-1のプローブ先端部の脱着可能な感応部位として用いた. 測定は, 先述したように, アルゴン雰囲気下バッチ式容器中の10ml検液に, 水分



Scheme 3-2 Modification of an optical fiber with chitosan and CPF.

を含む試料を順次添加して行った。

3.2 結果と考察

3.2.1 1-カルボキシプロピルフォルミルピレンの同定

3.1.2項で得られた黄色結晶はシリカゲルTLC（展開溶媒：40%酢酸エチル／ヘキサン）で、原料の1-PBA ($R_f=0.23$) と異なる R_f 値 ($R_f=0.10$) を与えた。IR (Fig. 3-2) スペクトルより、原料の1-PBAには 1703cm^{-1} にカルボキシル基のC=O伸縮、 1450cm^{-1} にC-O伸縮、 1282cm^{-1} 、 1208cm^{-1} にO-H面内変角振動および 854cm^{-1} に芳香環のC-H面外変角振動が見られる。これに対し生成物には 1695cm^{-1} に新たにアルデヒドのC=O伸縮が観測され、CPFPの生成を示唆した。また、 ^1H NMR (Fig. 3-4)より、新たに δ 10.79にアルデヒドプロトン1個分が見られたことからピレン環のフォルミル化を示唆した。アルキル鎖部位は原料の1-PBA (Fig. 3-3) とほぼ同じ化学シフト値にシグナルを与えたが、 γ 位のメチレンdはH₂Oの大きなシグナルに重なっているものと思われる。

Table 3-1 Summary of ^1H NMR data of CPFP.

δ / ppm	Proton	Multiplicity	J / Hz	Integral
12.1	COOH	broad	—	0.63
10.79	CHO	s	—	1.00
9.40	Ar-H ①	d	9.64	0.54
9.33	Ar-H ①'	d	9.31	0.47
8.67	Ar-H ②	d	9.64	0.55
8.61	Ar-H ③'	d	9.24	0.45
8.55	Ar-H ⑤,⑤'	d	7.96	0.94
8.42	Ar-H ⑥,⑥	d	8.06	} 3.03
8.40	Ar-H ②'	d	8.86	
8.37	Ar-H ⑦,⑦'	d	8.07	
8.34	Ar-H ③	d	8.92	
8.29	Ar-H ④'	d	9.24	0.44
8.20	Ar-H ④	d	8.92	0.58
8.03	Ar-H ⑧,⑧'	d	7.80	0.94
3.40	H ₂ O/-CH ₂ -(d)	-		
2.39	-CH ₂ -(b)	t	7.23, 7.08	2.11
2.01	-CH ₂ -(c)	q	7.08, 6.99, 6.99, 7.02	2.02

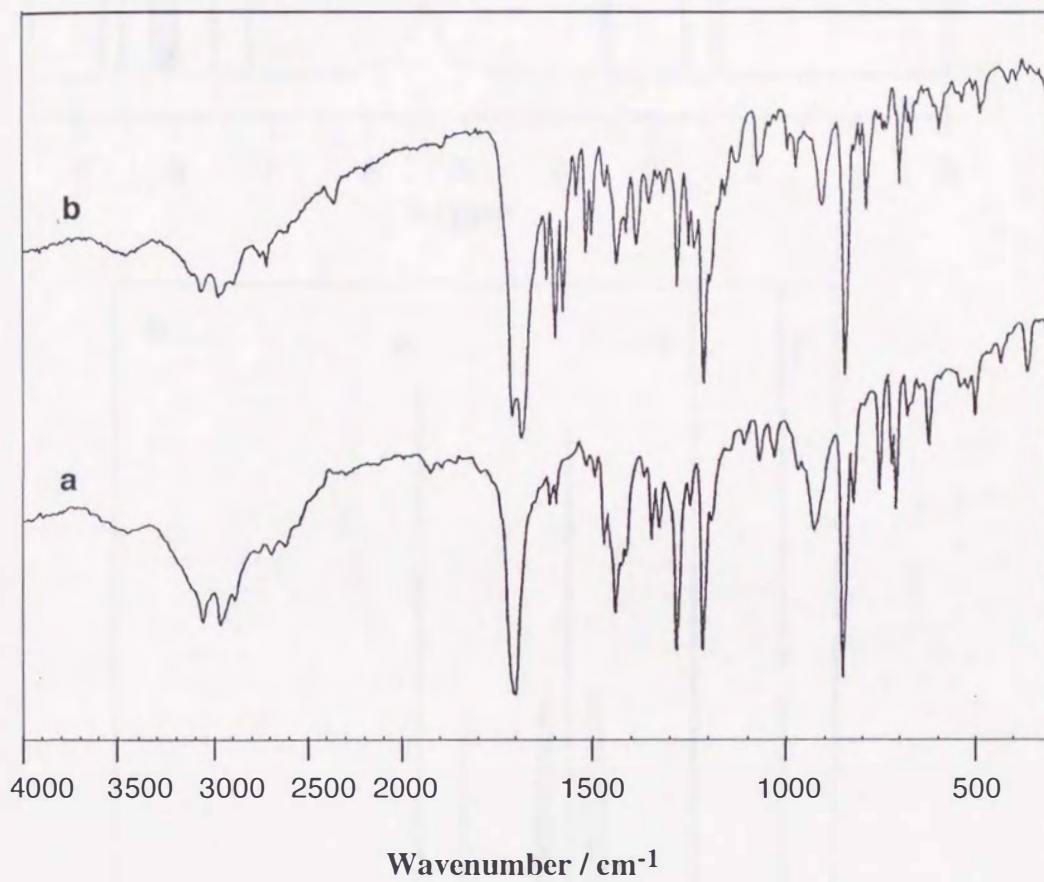


Fig. 3-2 IR spectra of (a) 1-PBA and (b) CPF.

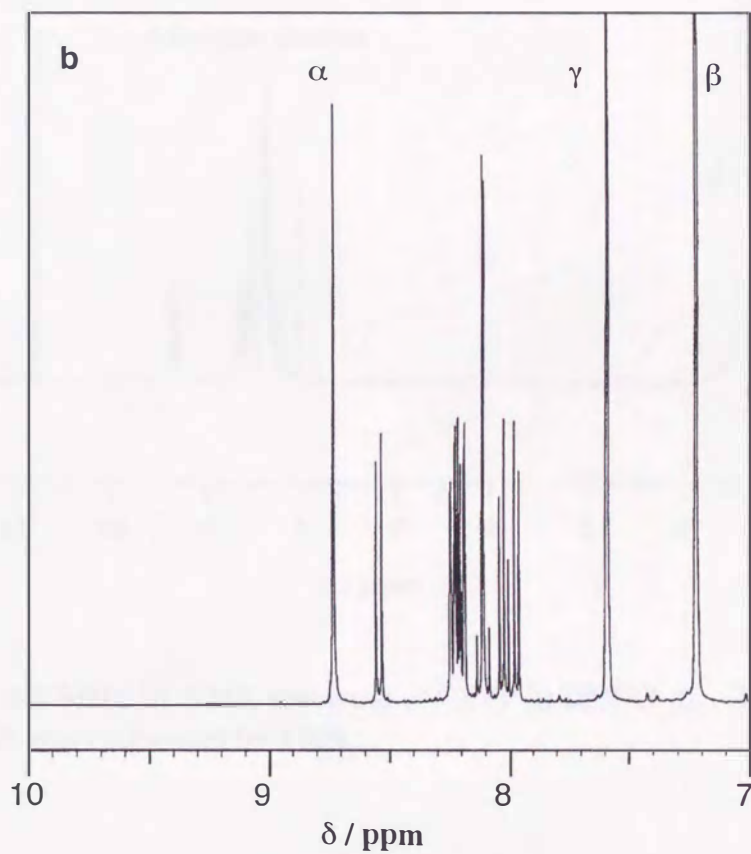
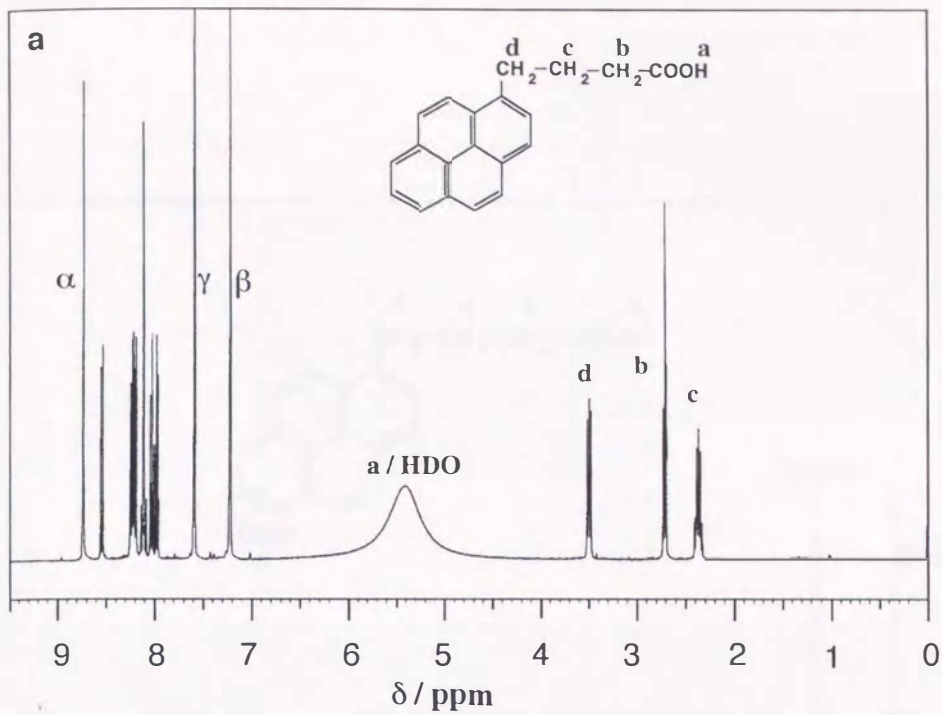


Fig. 3-3 400 MHz ^1H NMR spectra of 1-PBA in pyridine- d_5 : (a) entire spectrum; (b) partial spectrum. α , β and γ represent the signals of aromatic protons of pyridine. The chemical shift was calibrated by TMS.

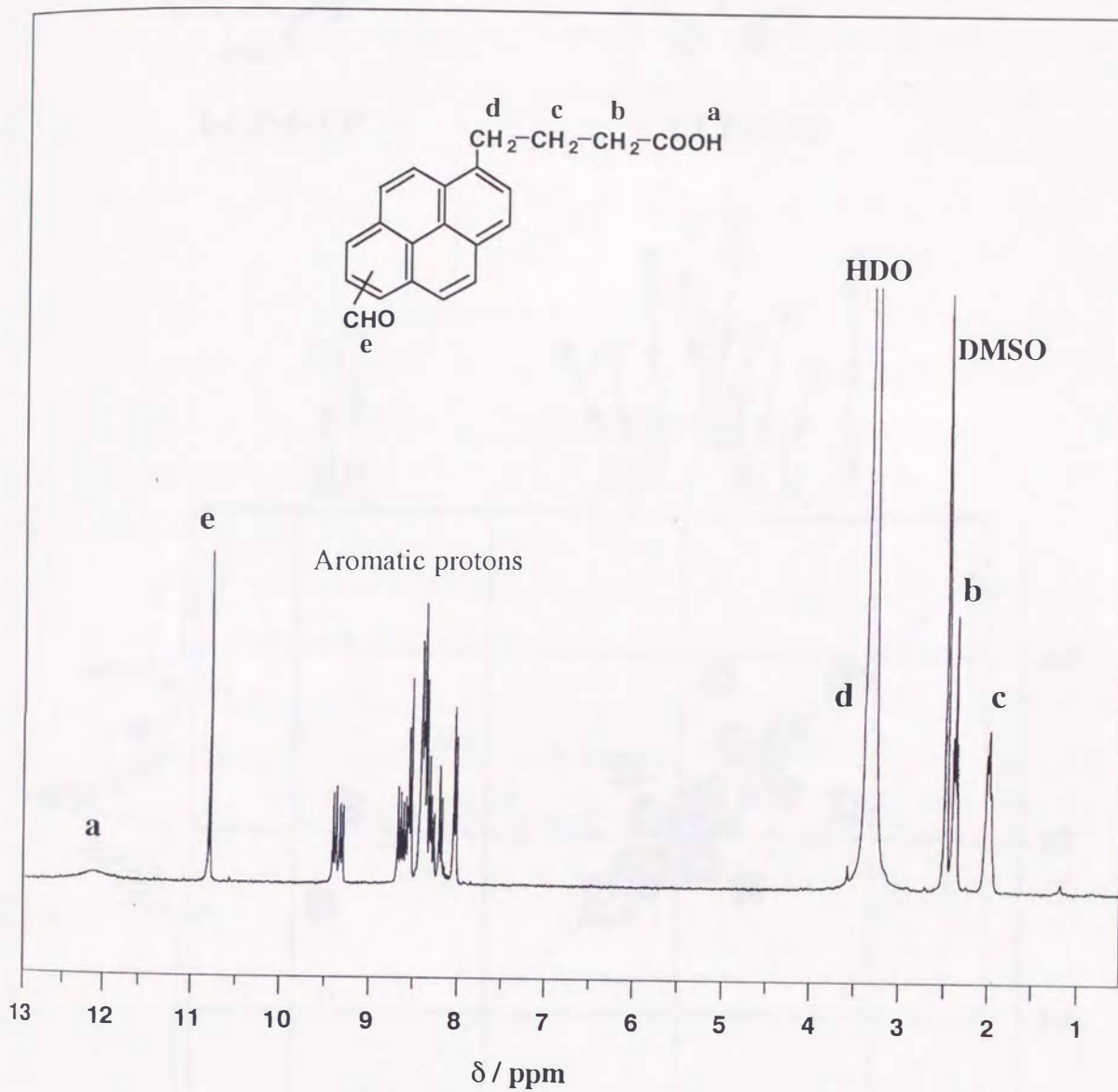


Fig. 3-4 400 MHz ¹H NMR spectrum of CFPF in DMSO-d₆. The chemical shift was calibrated by TMS.

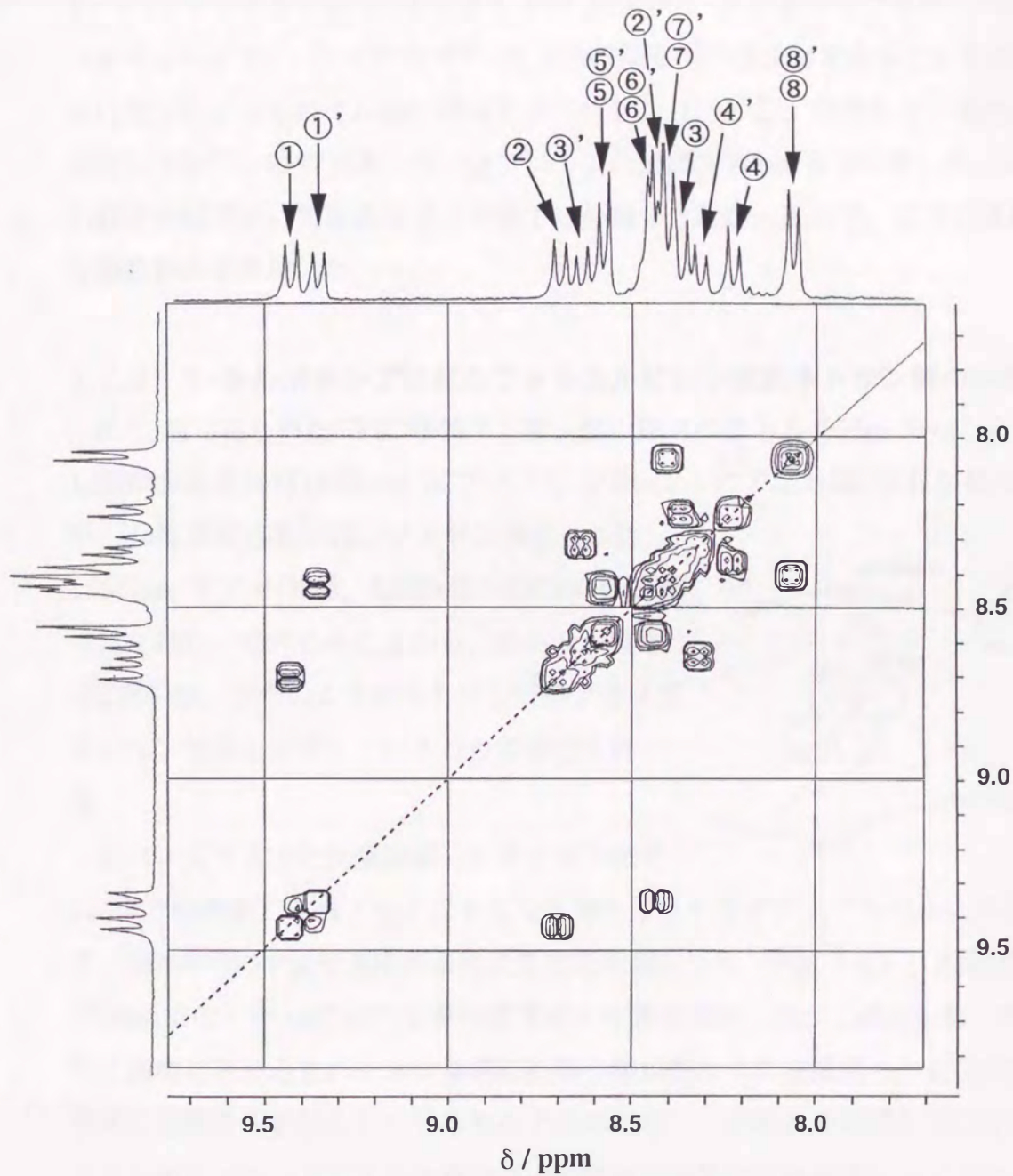
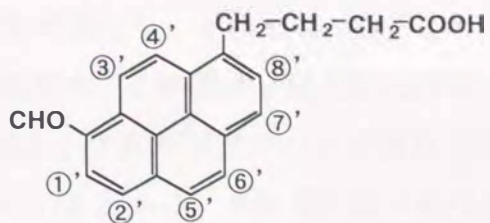
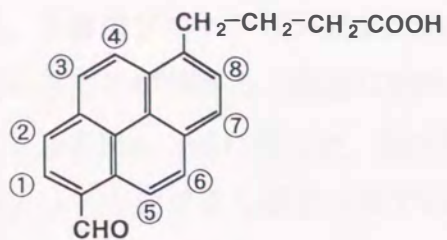
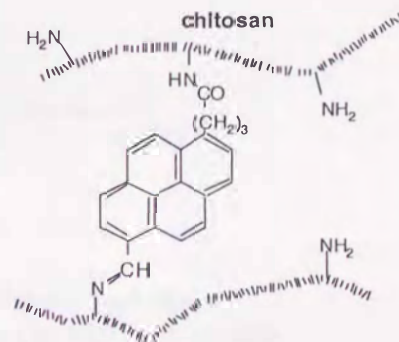


Fig. 3-5 Partial map of the 300 MHz H-H COSY spectrum of CPFP in DMSO-d₆.

一方、芳香環プロトンは1-PBAと大きく異なり、それぞれ一対のシグナルを与えていることが分かる。詳細な解析のため、この部分を拡大したH-H COSYスペクトルをFig. 3-5に示した。全てのシグナルがダブルットで現れており、シングレットのシグナルが見られていないことから、6位または8位以外へのフォルミル基の導入は起こっていないことが推定された。それぞれの相関からFig. 3-5のように帰属され、2種類のCPFPPすなわち、1-カルボキシプロピル-6-フォルミルピレン (1-CP-6-FP) および1-カルボキシプロピル-8-フォルミルピレン (1-CP-8-FP) の2つの異性体の混合物であることが明らかになった。フォルミル基に隣接するプロトン (①, ①') の比から、異性体の存在比は0.53 : 0.47であった。全プロトンの帰属をTable 3-1に示した。2つの異性体はTLC, 再結晶などの手段では分離できなかったため、以下の実験には混合物のまま用いた。

3.2.2 1-カルボキシプロピルフォルミルピレン修飾キトサン膜の分析

3.1.3項で得られたCPFPP修飾キトサン膜のIRスペクトルをFig. 3-6に示す。12時間反応後には 1662cm^{-1} にアミドI, 1560cm^{-1} にアミドIIの吸収が見られ、48時間反応後には、アミドの吸収以外に 1638cm^{-1} にC=N伸縮, 1702cm^{-1} にCHOの吸収も見られた。これらのことから、キトサン膜中でCPFPPは、右図のようにキトサン残存アミノ基と Schiff 塩基を形成していることが推定される。



カバーガラス上に別途調製したキトサン膜をCPFPPで修飾後、乾燥アセトニトリルを満たしたトライアングルセルに入れて、膜中のCPFPP蛍光強度の水による変化を測定した (Fig. 3-7)。励起波長 355nm での 470nm における蛍光強度は水の濃度増加に従って減少した。おそらく膜中に取り込まれた水含量増加に伴う親水的なマイクロ環境への変化が蛍光強度の変化を引き起こしているものと思われる。この現象を利用してCPFPPキトサン膜をプローブとする有機溶媒中の微量水分測定用蛍光ファイバセンサの作製とその応答特性を検討した。

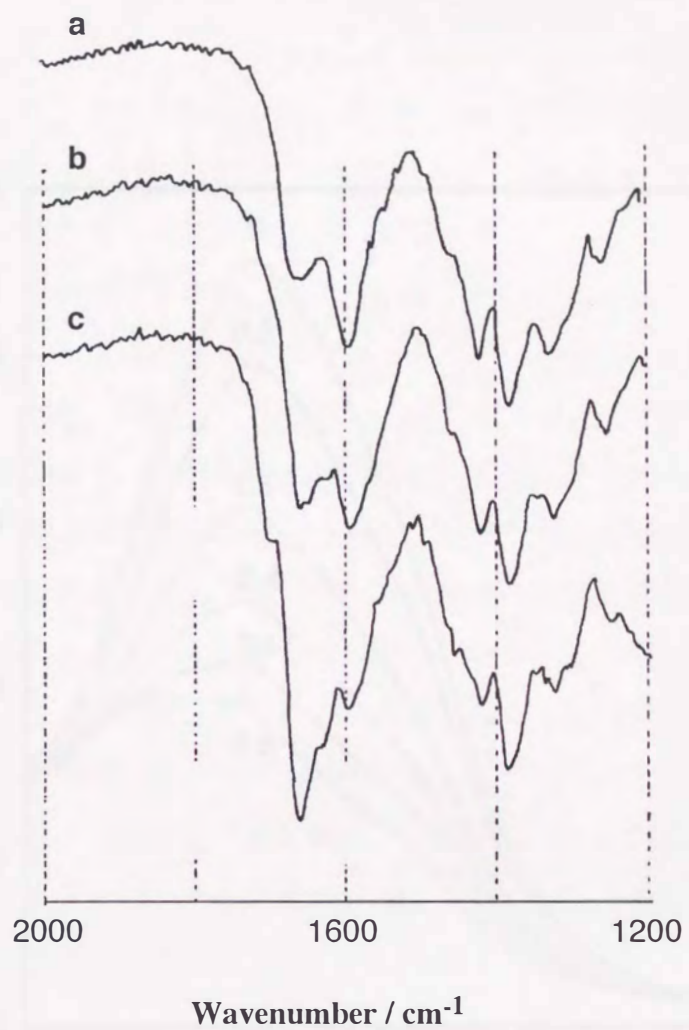


Fig. 3-6 IR spectra of (a) chitosan membrane and the membranes treated with CPF for (b) 12h and (c) 48h.

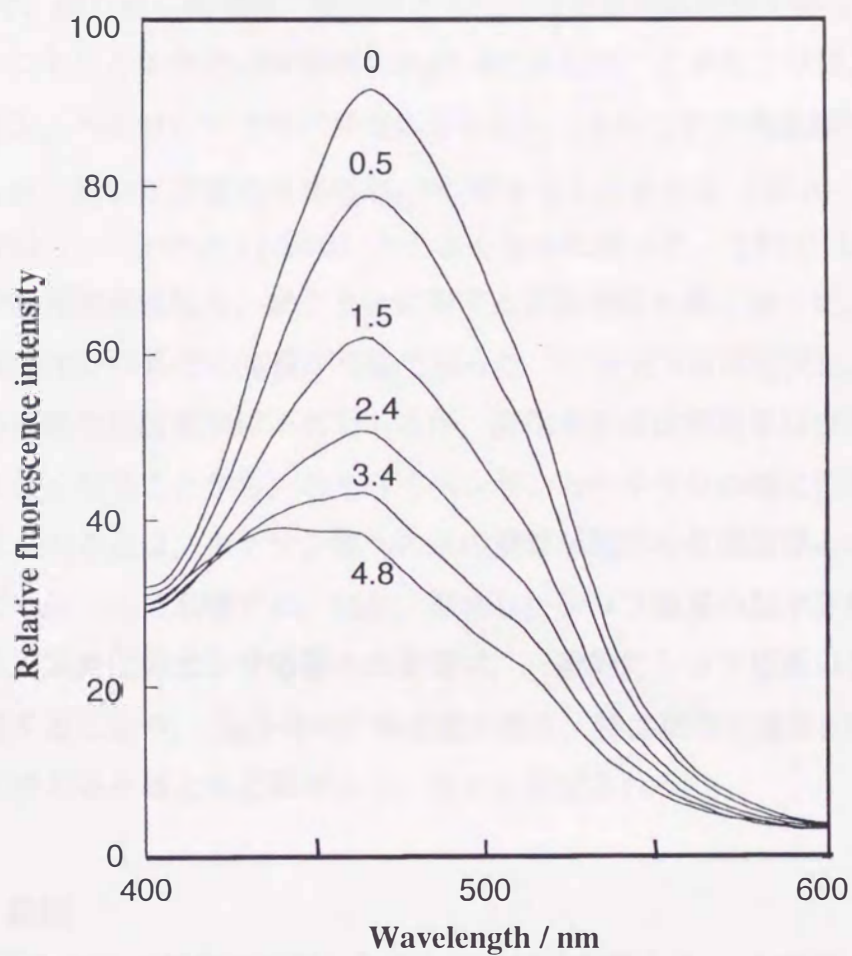


Fig. 3-7 Effect of water in CH_3CN on the fluorescence spectrum of a chitosan membrane modified with CPF. The numerical value on the spectra indicates water content in %. Excitation wavelength, 355 nm.

3.2.3 有機溶媒中の水含量測定

アセトニトリルおよび水へのセンサの応答をFig. 3-8に示す。アセトニトリルおよび水の入ったサンプル管を交互に取り替えることによって繰り返し再現性を検討した。アセトニトリル中で見られた蛍光は、水中では減少し、約30秒で一定値を保った。これを繰り返し、1週間30回の測定の相対標準偏差は±4.8%で、繰り返し再現性、耐久性ともに十分使用可能な値であった。また、アセトニトリル中水分の検量線をFig3-9に示した。このセンサは、ベンゼン、ケロセン、ヘキサン中でも同様な応答を示し、それぞれの検量線はFig. 3-10に示した。用いた溶媒の比誘電率 ϵ_r ¹⁸⁾がアセトニトリル(37.5)、ベンゼン(2.275)、ヘキサン(1.880)と小さくなるに従って、それぞれの有機溶媒中での蛍光強度は強く、また水分に対する応答感度も高くなった。ヘキサンの場合数ppmレベルでの定量が可能であった。ケロセンは高級炭化水素の混合物のため正確な比誘電率は不明であるが、炭化水素の比誘電率は炭素数が多くなると大きくなることから、おそらくベンゼンとヘキサンの間に位置するであろう。以上のことは、キトサン膜への水の濃縮が試料の有機溶媒との分配比に依存していることを示唆する。なお、期待したシッフ塩基の加水分解および再生に伴う蛍光変化のセンサ応答への影響は、一般的にシッフ塩基の生成には酸触媒を要することや、Fig3-8の応答速度の速さ、特に戻りの速さが数十秒であることを考えるとほとんど寄与していないと推定される。

3.3 総括

CPFPをアミド結合で修飾したキトサン膜を調製した。この膜からの蛍光は、微量水分の存在で低下する事を見いだした。キトサン膜の水に対する濃縮効果がCPFPのミクロ環境を親水的にし、そのために蛍光強度の減少が引き起こされたものと思われる。この修飾膜を応答部位とする有機溶媒中の微量水分測定用二股型光ファイバ蛍光センサを作製した。このセンサは誘電率の低い有機溶媒中での微量水分に対する応答感度が高く、ヘキサン中10ppm以下の水分測定が可能であった。また、1週間30回の測定の相対標準偏差は±4.8%で、繰り返し再現性、耐久性ともは十分実用的に使用可能な値であった。以上のこ

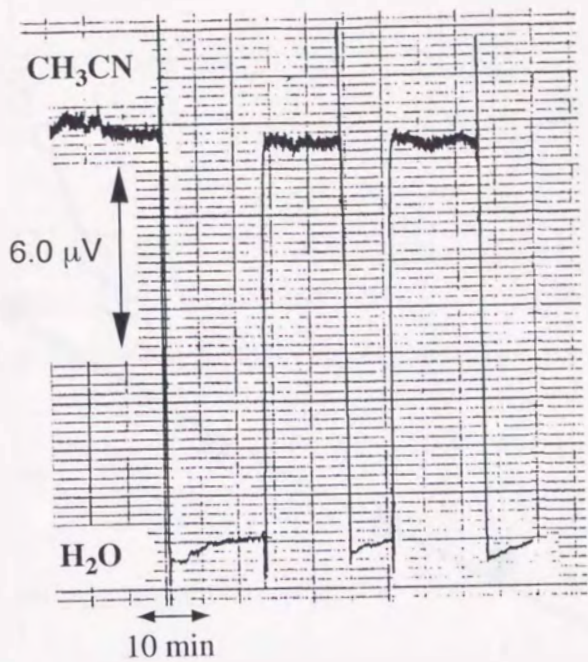


Fig. 3-8 Typical responses of the sensor to water and CH_3CN .

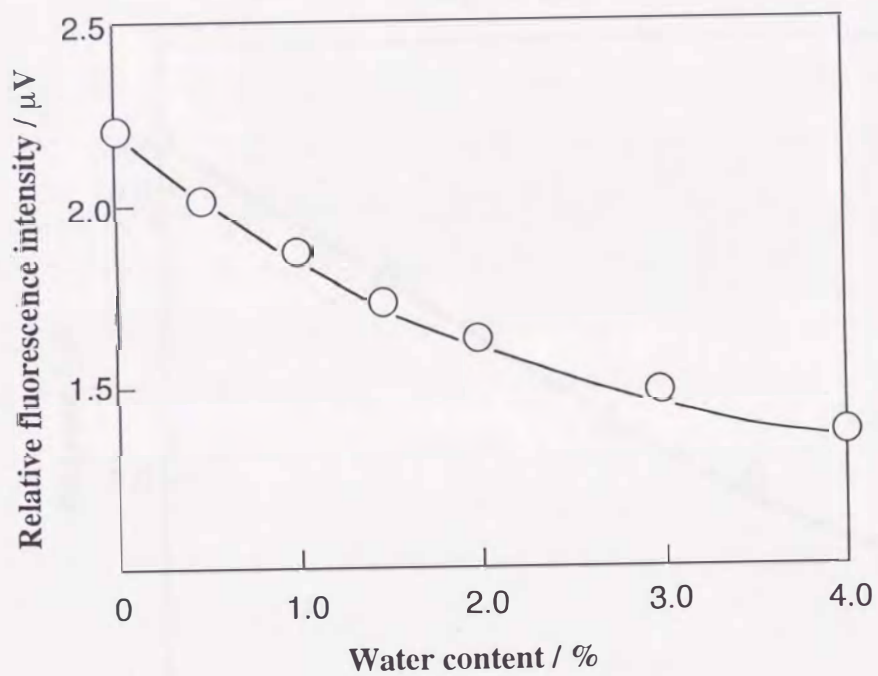


Fig. 3-9 Relationship between the response and water content in CH_3CN .

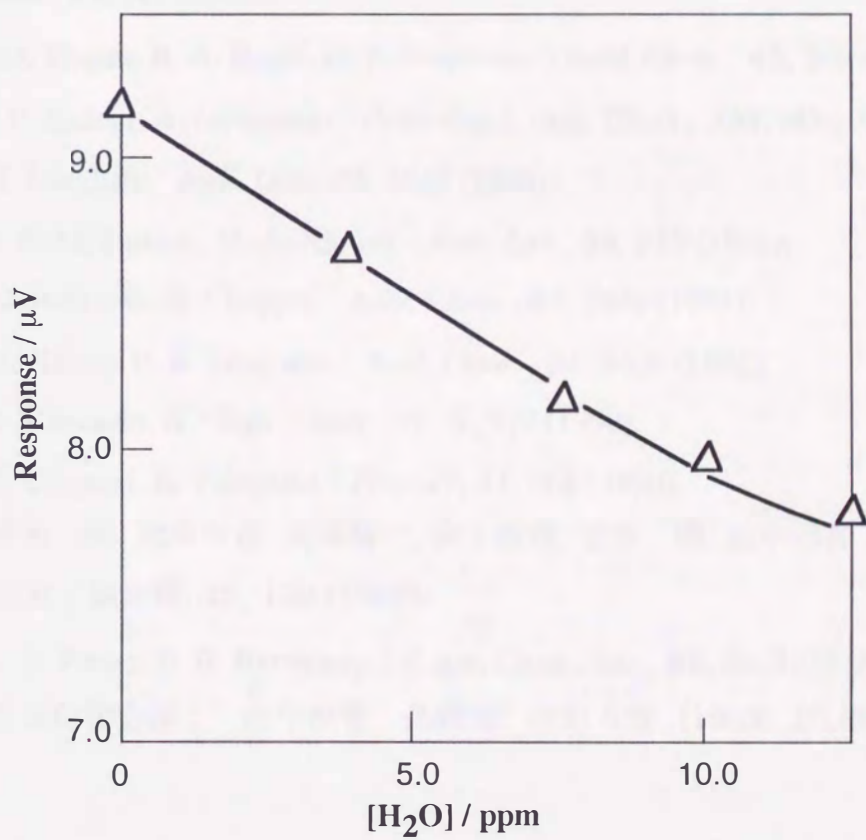
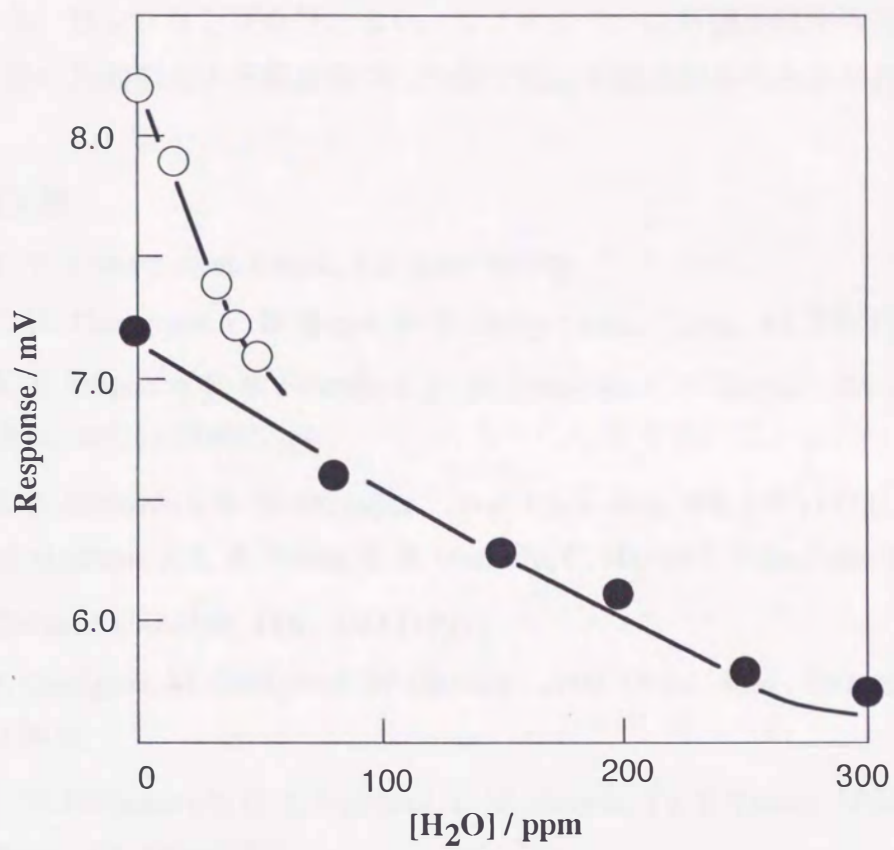


Fig. 3-10 Relationships between the response and water content in benzene (●), kerosen (○) and hexane (Δ).

とから、サンプリングを伴わない、リアルタイムな有機溶媒中の微量水分分析、特に石油製品の行程管理等に利用できる可能性があると思われる。

参考文献

- 1) Y. Y. Liang : *Anal. Chem.*, **62**, 2504 (1990).
- 2) C. D. Thompson, F. D. Bogar, R. T. Foley : *Anal. Chem.*, **42**, 1474 (1970).
- 3) A. T. Pilipenko, E. R. Falendysh, O. M. Drapailo, V. A. Zayats : *Zh. Anal. Chim.*, **44**, 51 (1989).
- 4) C. E. Matkovich, G. D. Christian : *Anal. Chim. Acta*, **60**, 319 (1972).
- 5) M. Guzman, J. L. P. Pavon, E. R. Gonzalo, C. Hatfield, J. Ruzicka, G. D. Christian : *Analyst*, **116**, 1043 (1991).
- 6) S. Garrigues, M. Gallignani, M. Guardia : *Anal. Chim. Acta.*, **281**, 259 (1993).
- 7) T. N. Gvozdoich, G. S. Grinberg, L. V. Zuyeva, Ya. I. Yashin : *Petroleum Chem.*, **12**, 120 (1972).
- 8) J. M. Hogan, R. A. Engel, H. F. Stevenson : *Anal. Chem.*, **42**, 249 (1970).
- 9) R. P. Badoni, A. Jayaraman : *Fresenius J. Anal. Chem.*, **338**, 745 (1990).
- 10) H. Langhals : *Anal. Lett.*, **23**, 2243 (1990).
- 11) S. S. M. Hassan, M. A. Ahmed : *Anal. Lett.*, **24**, 817 (1991).
- 12) L. Stefan, G. R. Choppin : *Anal. Chem.*, **63**, 2542 (1991).
- 13) H. Huang, P. K. Dasgupta : *Anal. Chem.*, **64**, 2406 (1992).
- 14) Y. Kurauchi, K. Ohga : *Anal. Sci.*, **6**, 919 (1990).
- 15) T. Uragami, K. Takigawa : *Polymer*, **31**, 668 (1990).
- 16) 身矢 勝, 岩本令吉, 美馬精一, 山下修蔵, 望月 明, 田中善喜 :
高分子論文集, **42**, 139 (1988).
- 17) L. F. Fieser, E. B. Hershberg : *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 2542 (1938).
- 18) 日本化学会編 : ” 化学便覧 基礎編 ” 改訂 3 版, (1984), (丸善).