

## 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 :

#### 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

キトサン膜およびその化学修飾体は高い親水性を有しており水を選択的に透過するため、浸透気化法や気化浸透法によるエタノールの分離濃縮膜として有用であることが報告されている<sup>1,2)</sup>。この膜を水や有機溶媒と接触させると、浸透する溶媒の極性や疎水性の違いによって膨潤収縮が観測される。この現象は膜の密度さらには屈折率の変化を引き起こすことが予想される。従って、このような性質を有する膜を光ファイバのクラッドとした場合、屈折率変化に伴う臨界角の変化がコア内を通過する光量の増減を引き起こすことになる。本章では、この性質を利用した内部全反射型光ファイバセンサについて考察する。

現在、地下水や工場排水中の揮発性有機溶媒は一般的にヘッドスペースガスクロマトグラフィーによって分析されている<sup>3,4,5)</sup>。この方法は高感度、高選択的であるが、試料調製や分離過程等に煩雑な操作を要する。一方、いくつかの光ファイバセンサが塩素化炭化水素 (CHC) や水中の有機溶媒の分析に利用されている。この方法は試料のサンプリングの必要がなく、また光ファイバの有する遠隔操作性にも優れている特性のため、リアルタイムな排水管理や地下水汚染監視等の環境分析への利用の可能性を有している。

例えば、藤原反応<sup>6)</sup>を利用した感応部位をもつ光ファイバセンサは、水中のクロロホルム<sup>7,8)</sup>やトリクロロエチレン<sup>9)</sup>の分析に対して高い感度と選択性を有することが報告されている。しかし、センサプローブ部位に反応で消費されるピリジンを用いるため、繰り返し使用を可能にするには、ピリジン供給・交換システムの設計や液漏れ防止策等の工夫が必要であり、実用化が困難である。一方、光ファイバ先端に固定化したトリフェニルメタン色素の吸収スペクトルの変化<sup>10)</sup>やナイルレッドの蛍光変化<sup>11)</sup>を排水中の揮発性有機溶媒分析へ利用した報告がある。この場合、ガス透過膜をプローブ部分に用いている割には応答速度は速いが、温度の影響を非常に受けやすい欠点を有している。また、CHC親和性の高い疎水的なポリシロキサン膜をクラッドとする、石英コアの光ファイバを用いたエバネッセント波吸収型の近赤外線利用のセンサ<sup>12,13)</sup>やハロゲン化銀のコアを有する赤外線検出型のセンサ<sup>14,15,16)</sup>も報



告されているが検出感度が低かったり，ハロゲン化銀の場合には紫外・可視光の影響を受けるなどの欠点を有する．以上のように，水中の有機溶媒やCHCのような揮発性汚染物質を対象とした光ファイバセンサの実用的な開発に関してはまだ十分ではなく，検討の余地があると思われる．

もう一つのターゲットとして，酒類中のリアルタイムなエタノール定量への応用が挙げられる．従来の比重法や滴定法に代わるものとして近年多数のバイオセンサがその目的のために検討されている．中でも一般的なものはアルコール脱水素酵素を固定化した酵素電極<sup>17,18,19)</sup>であろう．アルコールオキシダーゼを固定化したものはワイン中<sup>20)</sup>や日本酒中<sup>21)</sup>のエタノールの定量に用いられている．さらに，これらの酵素を用いた光ファイバセンサも近年報告されている<sup>22,23,24)</sup>．これらのセンサの利点は高い選択性，感度，センサ作製の簡易さにあろう．しかし，アルコール連続発酵法やビール製造過程などのような実際の微生物発酵工業の工程管理にこれらを応用しようとする場合，酵素センサは寿命が数週間と短いことや，一般的に1%濃度以下という高い検出感度のために逆にそのまま利用することが困難になるという欠点を有する．

トリフルオロアセトフェノン誘導体を含んだ，可塑化PVC膜を応答部位とする光学センサ<sup>25)</sup>は，高い選択性，0.5~35v/v%という広い測定範囲，さらには30秒という早い応答性を示すが，食品工業への利用を考えた場合，用いる薬品の漏れや，安全性が不明である．表面プラズモンの変化をもとにしたエタノールの直接定量用センサ<sup>26)</sup>は，この点では薬品も使用せず安全と思われるが，実試料への応用を考えた場合，共存物の妨害が懸念される．以上のことから，リアルタイムに使用できるエタノールセンサの開発は十分魅力的なものと思われる．

本章では，キトサン/PVA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作製および水中に溶けた揮発性有機化合物への応答特性の検討，さらには上述した観点に立った分析対象物についてのセンサの応答特性を詳細に検討し，実試料測定への可能性について述べる．

#### 4.1 応答機構

はじめに，本章で用いた内部全反射型の光ファイバセンサの応答機構につい

て解説する。用いた光ファイバはステップインデックス型光ファイバで、コアと呼ばれる光を伝播する屈折率の大きな円柱部分と、コアを取り巻くように配置されたコアより屈折率の小さなクラッドと呼ばれる部分から成っている。クラッドの周囲には光ファイバの保護と強度を向上させるためにシリコン樹脂やナイロン等で被膜してある。

二つの誘電体間の境界上での光反射量は、次式のアレネルの反射法則によって得られる反射係数  $\rho$  を二乗した反射率  $R$  に従う。

$$\rho_s = \frac{n_1 \cos \theta_i - \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_i}}{n_1 \cos \theta_i + \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_i}} \quad \dots 1)$$

$$\rho_p = \frac{-n_2^2 \cos \theta_i + n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_i}}{n_2^2 \cos \theta_i + n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_i}} \quad \dots 2)$$

ここで、 $\theta_i$  は入射角、光は屈折率  $n_1$  の媒体から  $n_2$  の媒体に入射するとして、1) 式は垂直偏光、2) 式は平行偏光に関する反射式である。上式に従って反射率  $R$  と入射角  $\theta_i$  の相関をプロットすると、屈折率の大きな媒体から小さな媒体 ( $n_1 > n_2$ ) に入射する場合に限り、ある特定の値以上の入射角を持つ光は全反射することになる。この角は臨界角  $\theta_c$  とよばれる。光ファイバ内でも同様で、コア ( $n_1$ ) とクラッド ( $n_2$ ) の界面において  $\sin \theta_c = n_2 / n_1$  で与えられる臨界角  $\theta_c$  よりも大きな入射角をもつ光のみが全反射を繰り返してコア内を伝播する。従って、クラッドの屈折率が分析対象物のクラッド膜中への浸透によって変化するなら臨界角の変化を引き起こし、伝播光量に影響を与えることになる。序論で述べたように、本実験ではクラッドにキトサン/PVA膜を用いるため、水中の有機溶媒の濃度に応じてクラッド膜の屈折率 ( $n_2$ ) が変化することが予想され、この変化が全反射角の変化を引き起こし、さらには伝播光量に影響を与えて応答として検出されることになる。

## 4.2 実験

本節では、実験に用いた試薬と材料、センサの作製に関する具体的手順、および測定項目毎の実験方法に関して述べる。



#### 4.2.1 試薬

キトサンは加ト吉から提供された95%脱アセチル化したものをそのまま用いた。ポリビニールアルコール (PVA; 分子量72,000) と非晶質のフッ素樹脂 (Teflon AF 1600) はデュポンから購入した。フッ素系溶剤 (Florinato FC 72) とフッ素系非イオン性界面活性剤 (Fluorad FC-431) は住友 3 Mから購入したものをそのまま使用した。グルタルアルデヒド (GA; 電子顕微鏡用, 20%) は和光純薬工業より, 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購入したものをそのまま使用した。水はMILLI-RO15逆浸透純粋製造装置を通した水道水を再度イオン交換処理して用いた。その他の試薬は全て市販特級品を使用した。

#### 4.2.2 センサ応答部位の作製

石英製光ファイバ (昭和電線電纜SF-S800/1000, 直径1mm) を長さ80 mm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。このロッドの両端15mmをそれぞれポリ塩化ビニールのTHF溶液に浸漬後風乾し保護膜を形成した。これを46%のフッ化水素酸に室温で45分間浸漬しロッド中央部分の石英クラッドのみを溶解除去した。次にポリ塩化ビニールを取り除き, 120°Cで2時間減圧乾燥後, 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中でアルゴン雰囲気下85°C12時間反応させた。これをメタノールで洗浄後, 150mgのキトサンを含む $0.25 \text{ mol dm}^{-3}$  酢酸バッファ (PH6.0) 13 ml中で60°C, 48時間反応させた。このキトサンを共有結合させたロッドを, 2 v/v%酢酸水溶液で数回洗浄後  $0.37 \text{ mol dm}^{-3}$  アンモニア水溶液, 続いて蒸留水で洗浄した。次に200mgのキトサンと200mgのPVAを含む1 v/v%の酢酸水溶液20ml (クラッド原液A) に浸漬後引き上げ, 30°Cで一晩風乾して石英コアの外周にキトサン/PVAクラッド薄膜を形成させた。得られたクラッド薄膜は  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH水溶液, 続いて水に浸漬洗浄後, 1.6 wt%GA水溶液中50°C12時間加熱し架橋した。

さらに, テフロン保護をクラッド上に被覆する場合, 界面活性剤Fluorad FC-431の0.02wt%酢酸エチル溶液に浸漬し直ちに引き上げた後, 336mgのフッ素樹脂を溶解した10mlのFluorinert FC72 溶液中に浸漬風乾してコー

ティングした。以上の応答膜調製手順をScheme 4-1に示す。

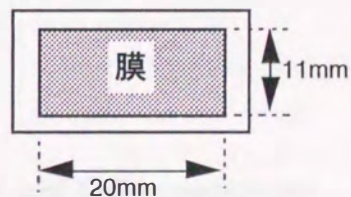
得られた光ファイバはFig. 4-1aに示した2重管型のテフロンセル中心部（斜線部, C）にエポキシ樹脂で接着しその外側をステンレス管（太点線, B）で覆った。試料の出入口はDで、光ファイバとステンレス管の間を流れる。その外側には恒温水を流し一定温度を保った。セルの両端は、初め800番の研磨紙で続いてアルミナ研磨剤（Fujimi Metapolish No.4）で鏡面研磨した。Fig. 4-1bは光ファイバ端の拡大断面図である。石英コア（H）を覆う石英クラッド（G）は、両サイドに一部分残してあり、キトサン/PVA膜（斜線部分, I）がロッド中央部を覆っている。

#### 4.2.3 装置組立と測定手順

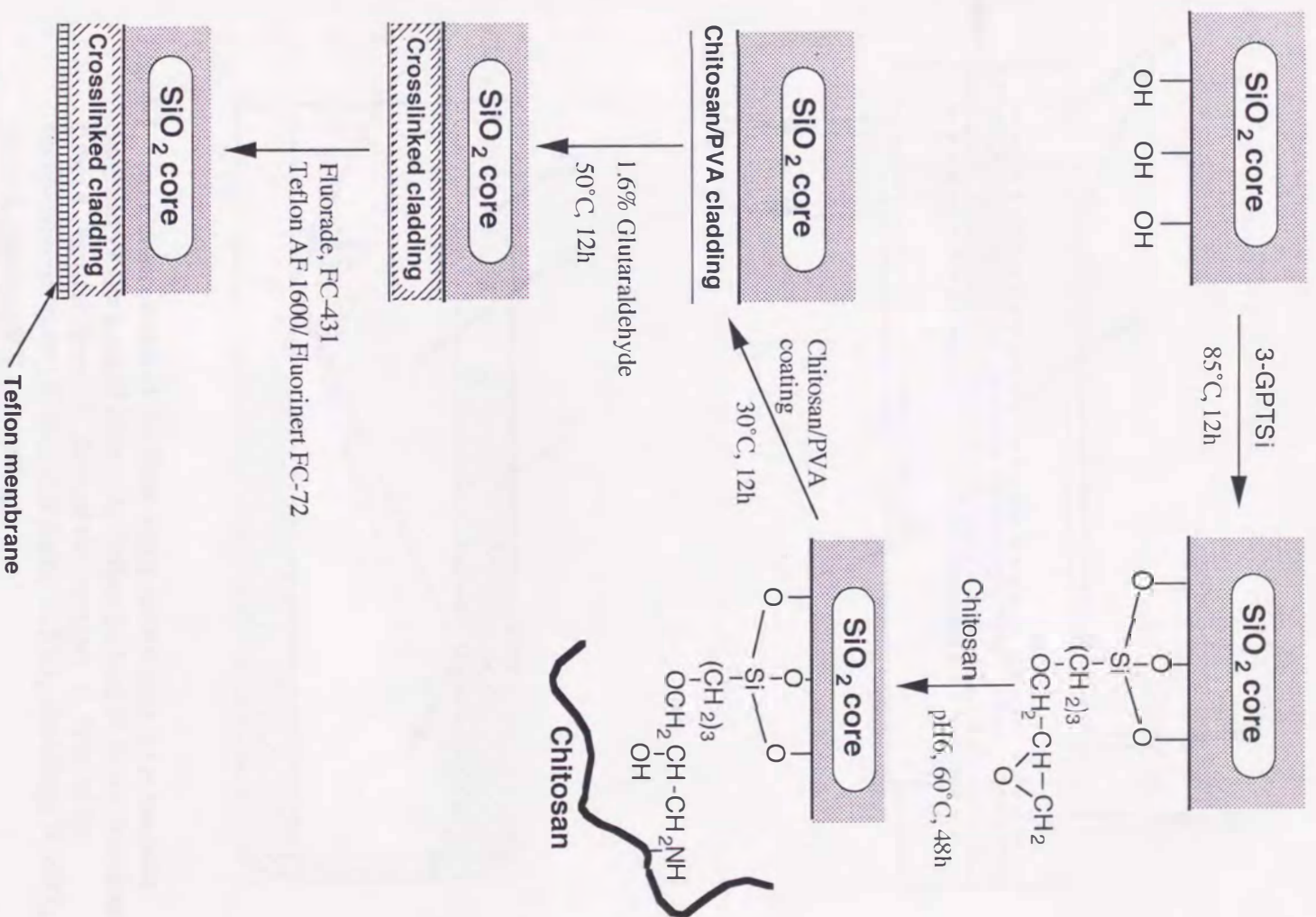
前項で作製したセルを紫外可視分光光度計（日本分光UVIDEC-610A）の試料光路に自製ホルダーとともにセットし、焦点距離20 mmの球面平凸レンズでセルの光ファイバ端面に集光した。レファレンス光路には未処理の光ファイバの両端を鏡面研磨したものを同レンズと共にセットした。

試料はペリスタポンプ（東京理科, MP-3）と6方ロータリーバルブ（GLサイエンス, LBV-FR6）をもちいて、順次切り替えて内部セルに導入した。内部セルの容積は $0.41\text{cm}^3$ で滞在時間は約8秒であった。検出波長は500nmで、恒温水をセルの外側に循環させ温度を $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に保った状態で測定した。センサの応答速度は試料注入後、応答の定常値の95%に達するまでの時間で評価した。

屈折率測定に用いたキトサン/PVA膜は別途、以下の手順で調製した。まず、キトサン40mgとPVA40mgを含む2%酢酸水溶液4mlを、内表面を研磨した内径5cmのテフロンシャーレにキャストし30℃インキュベーター中で一晩風乾した。得られた膜を $13 \times 22\text{mm}$ に切り取り、取り扱いやすいように右図のように中をくり抜いたテフロン枠板2枚で挟み両面テープで接着固定した。次に $1\text{mol dm}^{-3}$  NaOH に3時間浸漬・水洗後、 $0.16\text{mol dm}^{-3}$  GA水溶液中で50℃で12時間架橋した。この膜を任意のサンプル中に5分間浸漬後、余分な水分を軽く拭き取って







Scheme 4-1 Preparations of the chitosan/PVA cladding and Teflon membrane

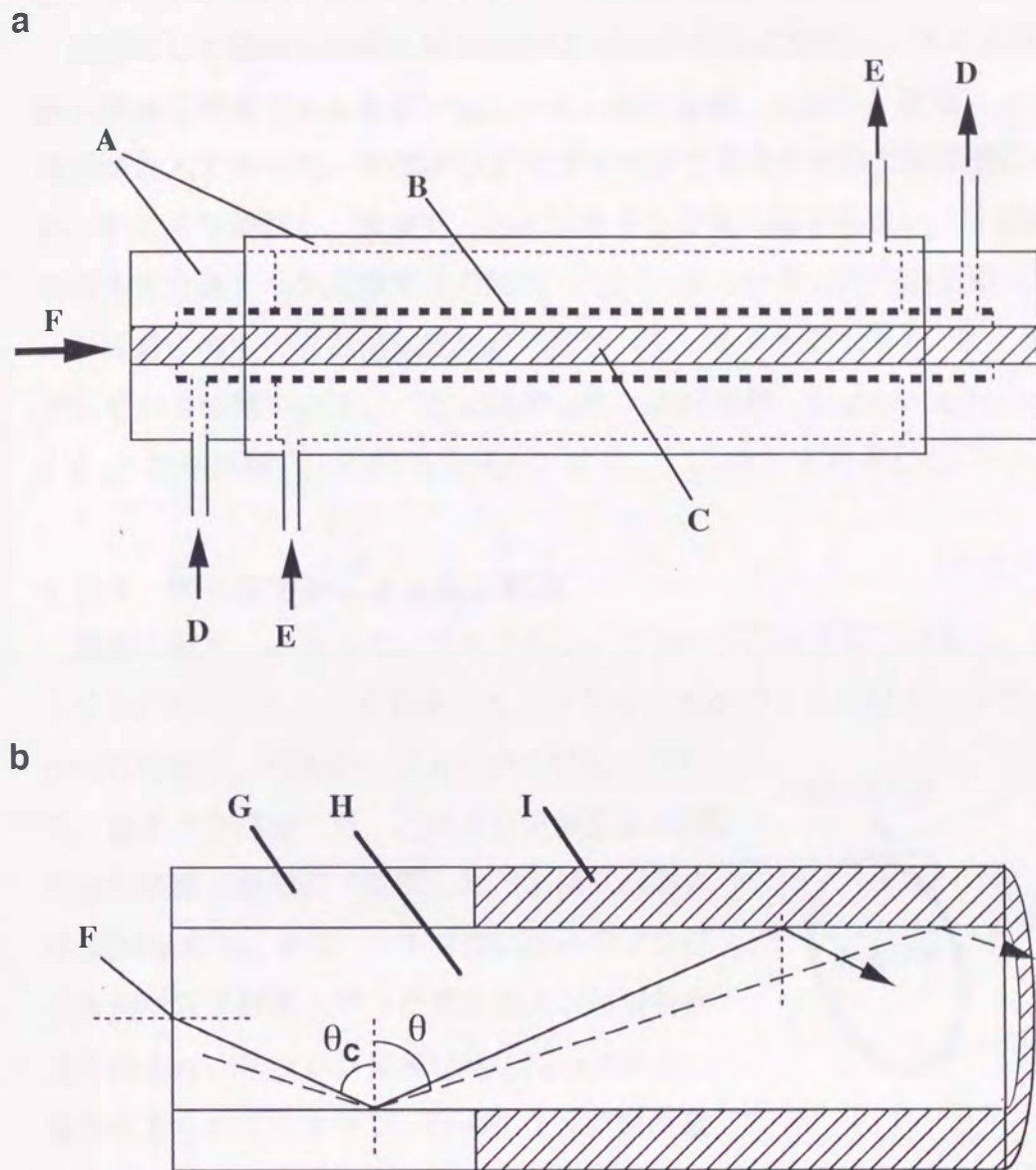


Fig. 4-1 (a) Construction of the fiber-optic sensor and (b) schematic diagram of the optical fiber. A, Teflon jacket; B, inner stainless tube; C, optical fiber; D, flow of the sample; E, flow of the thermostated water; F, incident light; G, SiO<sub>2</sub> cladding; H, SiO<sub>2</sub> core; I, chitosan/PVA cladding

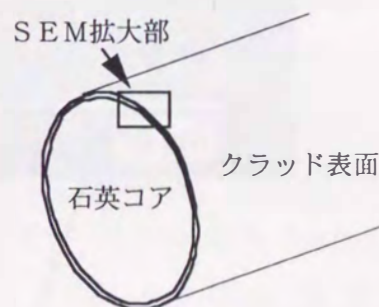


から、アタゴのアップ屈折計1-Tを用いてテストピース( $n_D=1.6199$ )と1-プロモナフタレン中間液とともに $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で測定した。この膜はセンサに用いたクラッド膜と同じ組成ではあるが、膜厚はより厚く、約 $30\mu\text{m}$ であった。

同様にして調製した膜を約 $0.2 \times 0.2\text{ mm}$ の断片に切断し、水または有機溶媒水溶液に浸漬すると膨潤が起こった。水に浸漬した場合、膨潤による面積の増加が最大であった。面積はCCDビデオカメラを取り付けた顕微鏡(Olympus BH-2)により観察し、浸漬前、および浸漬5分後の値を測定し、5回測定の平均値を測定値とした。浸漬前の面積( $S_d$ )、水に浸漬した時の面積( $S_w$ )および任意の濃度の有機溶媒浸漬時の面積( $S_o$ )をそれぞれ $3/2$ 乗することでそれぞれの体積 $V_d$ 、 $V_w$ 、 $V_o$ に換算した。収縮指標(Shrinking index)は $V_o/V_w$ 、膨潤指標(Swelling index)は $V_o/V_d$ として定義した。

#### 4.2.4 電子顕微鏡による表面観測

測定に使用した後のセンサを分解し、プローブ部分を取り出した。次に、キトサン/PVAクラッドを被覆したコア部分を石英ファイバ専用カッターで約 $3\text{ mm}$ に切断し、両面テープ上に斜めに貼り付けて、金を真空蒸着した。これを日立製S-4500電界放射型電子顕微鏡で観測した(右模式図およびSEM写真Fig. 4-2)。テフロンコーティングの表面は若干浮き上がった部分および付着物が見られるが、テフロン膜厚は約 $0.1\mu\text{m}$ であり、亀裂は見られずキトサン/PVAクラッド表面全体を覆っていた。その下には厚さ約 $1\mu\text{m}$ のクラッドが均一の厚みを持って石英コアを覆っているのが観測された。クラッド表面は石英ガラス表面と同程度に均一でなめらかであった。また重要な知見として、石英コアとクラッド膜との接合面が密着している様子も分かった。



#### 4.3 水中有機溶媒への応答

本節では、作製した光ファイバセンサの水中有機溶媒への応答特性および応答原理の確認を行い、実試料への適用の可能性を検討した。

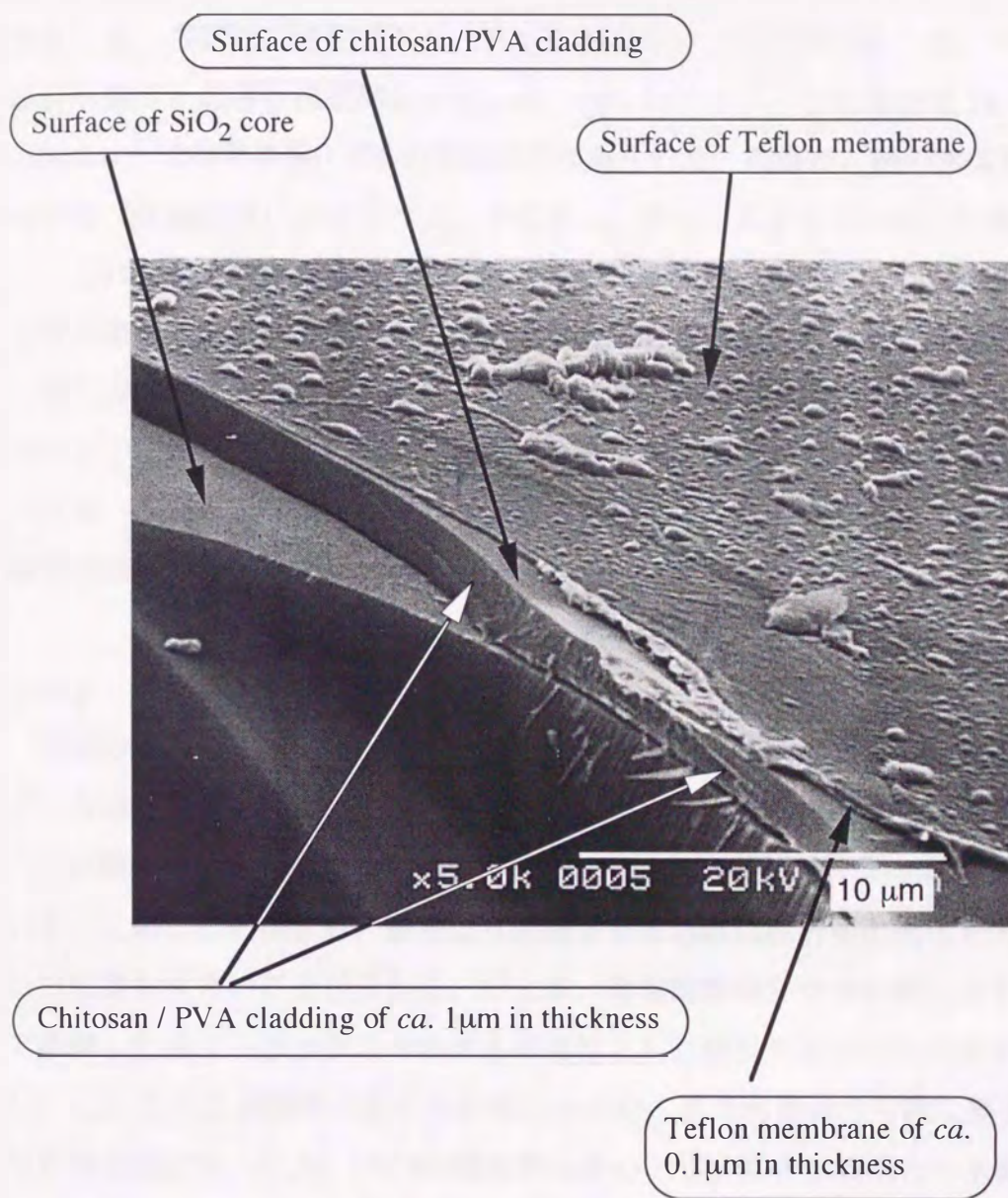


Fig 4-2 SEM image of the cladding membrane and Teflon protective coating



#### 4.3.1 応答特性

Fig. 4-3 に低級アルコール水溶液に対するセンサの応答を示す。各試料濃度は $0.5 \text{ mol dm}^{-3}$ であり、センサはテフロンコーティングを有していないものを使用した。応答は可逆的であり、正逆応答ともに1分以内であった。いずれの場合も濃度と応答に直線関係が見られ、例えばブタノールの場合  $0.11 - 0.55 \text{ mol dm}^{-3}$  で相関係数0.995の直線関係が見られた。同様に、他の水溶性有機化合物（有機溶媒）ジオキサン、アセトン、アセトニトリルに対しても応答し、これら有機溶媒の比誘電率と応答量の相関をFig. 4-4 に示した。アルコール類の場合、誘電率の低いものほど大きな応答を示し、同様な傾向が非プロトン性の溶媒についても見られた。ただし、その効果の程度はアルコール類と異なり若干弱かった。これらは、誘電率の低いものほどクラッド膜との相互作用が大きいことを示し、またプロトン性溶媒で見られた大きな応答は水素結合の関与を示唆している。

#### 4.3.2 応答量と屈折率および収縮率

前述の応答が、何に起因しているかを検討するため別途調製した膜を用いて、各種有機溶媒が膜の膨潤・収縮および屈折率に与える影響を見た。Fig. 4-5 は膜の収縮率と応答量の関係、Fig. 4-6は収縮率と屈折率の関係を表している。この二つの図より、膜をより収縮させる溶媒は屈折率の変化も大きく、かつ応答も大きいことが分かる。つまり、有機溶媒はクラッド膜に接すると水で膨潤した膜マトリックス中の水占有部位と入れ替わり局所的な水排除を起こし、この効果は誘電率の低いものほど大きい。また水素結合可能な部位を有する有機溶媒はキトサン、PVAの膜材料自身のアミノ基や水酸基との水素結合によって、より取り込まれ易くなり効果が増幅される事が推測される。ただし次に述べるように、応答が見られるのは、用いた石英ファイバのコアとクラッドの屈折率の範囲 ( $n=1.460 - 1.449$ ) でクラッド膜の屈折率が変化する必要があるが、Fig. 4-6 では大部分の溶媒でこの範囲から低い方にはずれている。この理由は、実際のセンサの場合のクラッド膜厚 ( $1 \mu\text{m}$ ) に対して屈折率測定用に別途作製した膜は約 $30 \mu\text{m}$ と厚いことから、センサ膜調製時と同じ条件でGA架橋処理を行っても架橋の程度が低くなっていることが原因と思われる。

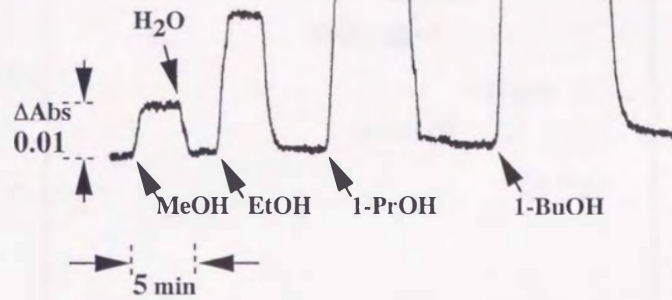


Fig. 4-3 Typical responses of the sensor to  $0.5 \text{ mol dm}^{-3}$  aliphatic alcohols.

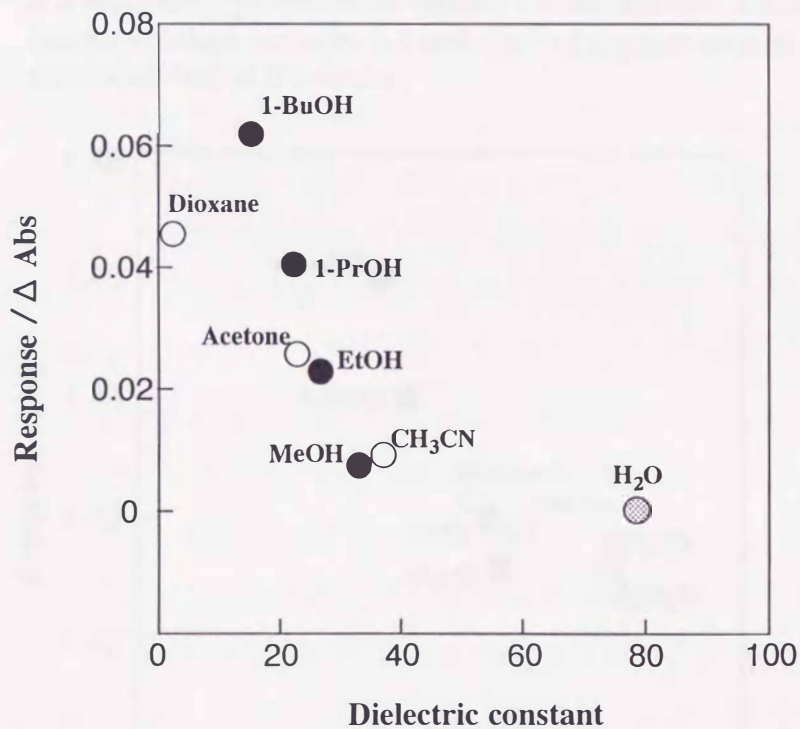


Fig. 4-4 Relationship between the response and dielectric constant of organic solvent. Each sample solution contains  $0.5 \text{ mol dm}^{-3}$  of organic solvent appended beside the circle.



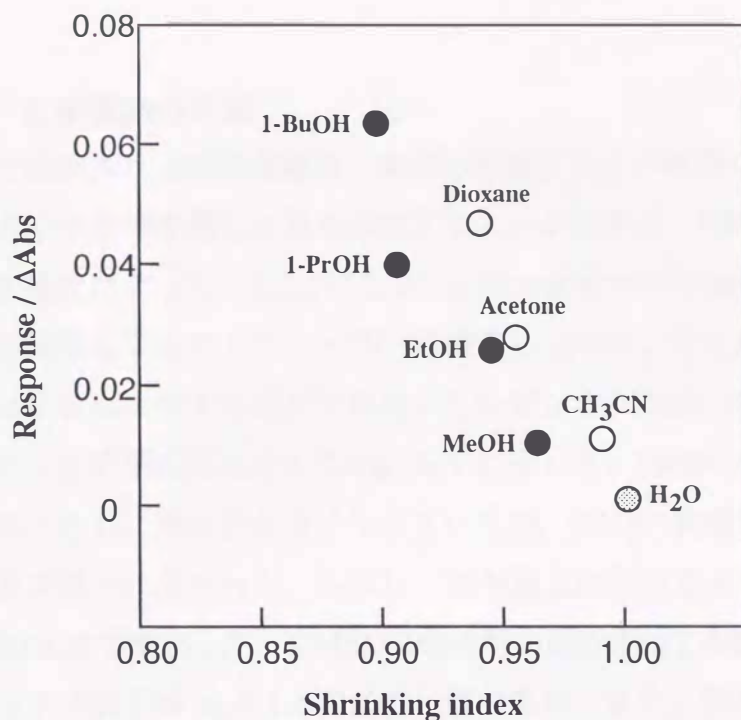


Fig. 4-5 Relationship between the response and the shrinking index. The test piece used for the determination of the shrinking index is a separately-prepared chitosan/PVA membrane. Each sample solution contains  $0.5 \text{ mol dm}^{-3}$  of organic solvent appended beside the circle.

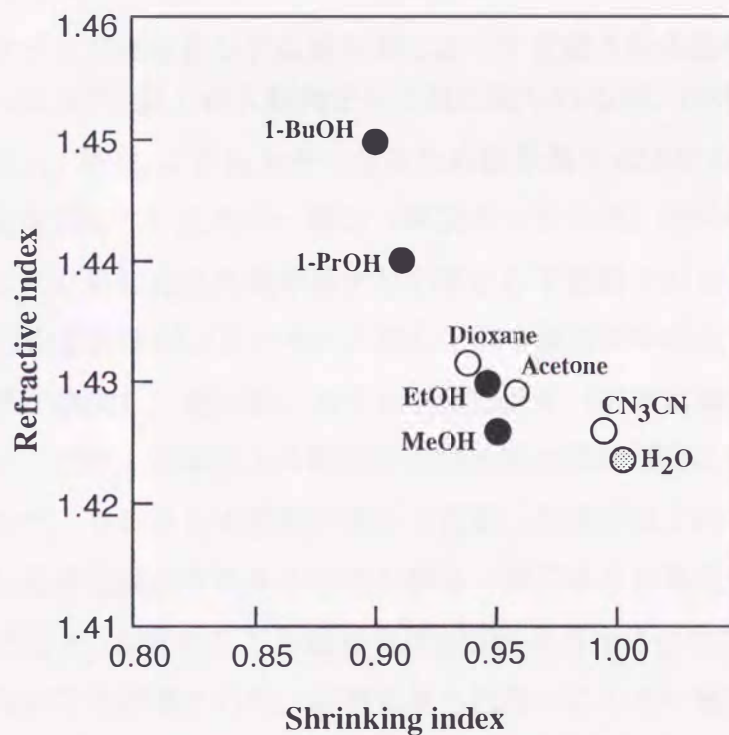


Fig. 4-6 Relationship between the refractive index and the shrinking index. The test piece used for the determination of the shrinking index is a separately-prepared chitosan/PVA membrane and each sample solution contains  $0.5 \text{ mol dm}^{-3}$  of organic solvent appended beside the circle.

### 4.3.3 応答機構の実証

上記で推測された応答機構は、両端の石英クラッドは残したままの光ファイバとDMSO水溶液を用いて直接確認することが出来る。DMSO水溶液の屈折率は、その濃度によって1.332から1.478の間で変化するために、光ファイバセンサの応答膜となるキトサン/PVAを被覆しないセンサを用いれば試料の屈折率が直接応答に反映するはずである。このセンサのDMSO水溶液に対する応答曲線をセンサの模式図とともにFig. 4-7に示した。DMSO水溶液の屈折率は濃度の増加とともに徐々に大きくなっていくが、DMSO濃度が約70%まではセンサの応答が見られなかった。しかし、70%以上になったとき突然応答が観測され、約90%まで増加した。DMSO70%の時の屈折率は1.446であり、これは石英クラッドの屈折率  $n_2 = 1.449$  に近い値である。また、DMSO90%の時の屈折率1.467は石英コアの屈折率  $n_1 = 1.460$  とほぼ等しい値である。

以上のことから応答はコアに接しているDMSOの屈折率  $n_2'$  とコアの屈折率  $n_1$  を用いた  $\sin\theta_c' = n_2'/n_1$  によって定義される臨界角  $\theta_c'$  の変化に影響されることが分かる。つまり、コア内を全反射して伝播する光は、光ファイバ両端に残したクラッド部分とコアの屈折率によって定義される臨界角 ( $\theta_c = \sin^{-1} n_2/n_1 = 82.96^\circ$ ) 以上の入射角をもつ光に限られるが、DMSO濃度70-90%の範囲では  $n_2'$  が  $n_2$  よりも大きくなるため臨界角も  $82.96^\circ$  より大きくなり、それまで全反射していた光の一部（高次モードの光）は外部に漏れ出ることになる。そのために透過光量が減少し応答として観測されると説明できる。

DMSOの屈折率がコアのそれと同じになる濃度90%の点では、クラッドとコアの境界が消失し、検出器に達する光量は最小（応答は最大）になることも矛盾しない。また、90%以上の範囲では屈折率の逆転が起こるためもはや全反射は起こらず、フレネルの法則に従って反射した光がコア内を進むため伝播光量が復活し応答は減少するものと思われる。同じように考えると、DMSO濃度70%以下では  $n_2'$  が変化しても臨界角は  $82.96^\circ$  より小さいので、伝播光量は影響を受けないことが考えられ、応答は見られないことと一致する。

以上の実験結果により、本センサの応答メカニズムは、クラッド膜の膨潤収縮で引き起こされた屈折率の変化によって説明されることが明らかになった。



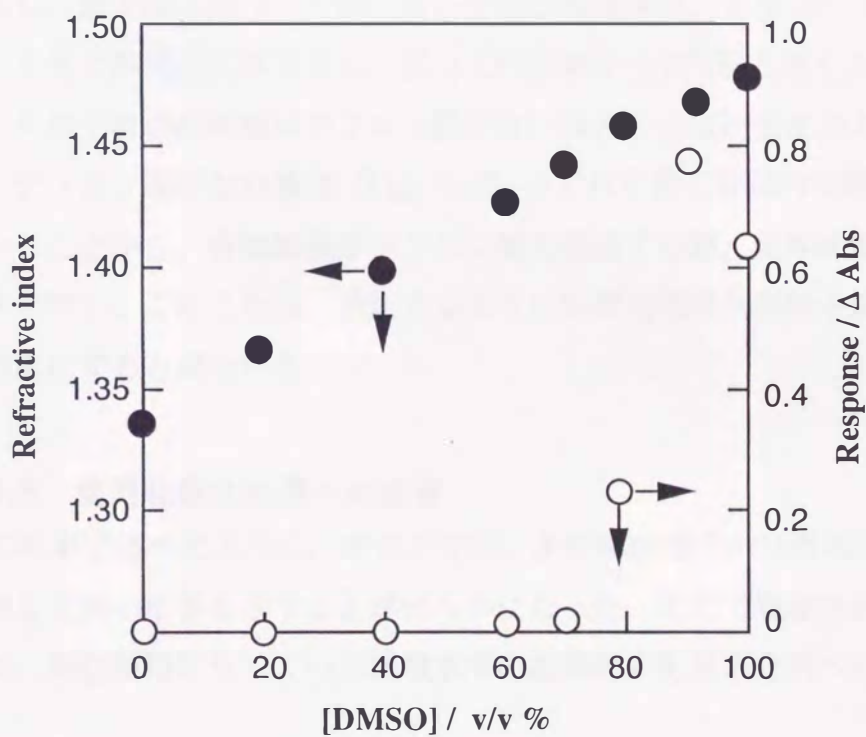
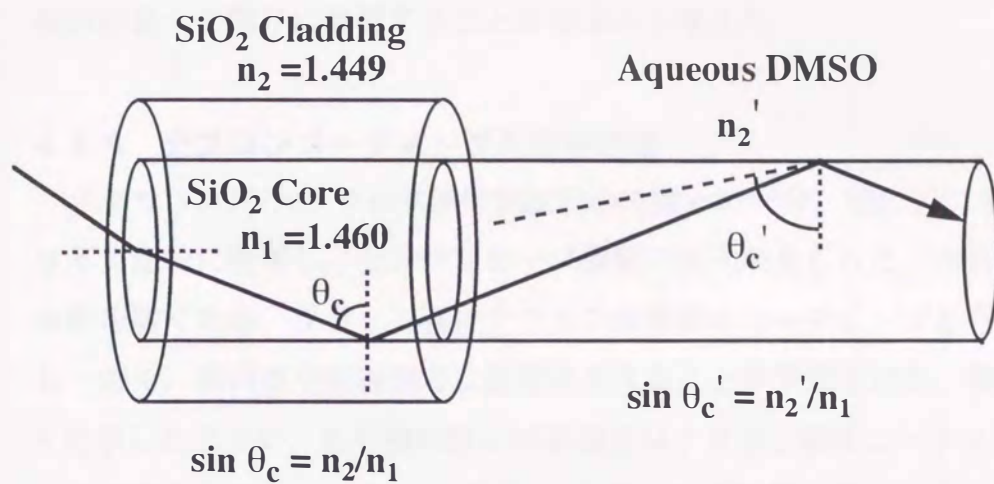


Fig. 4-7 Plots of the response and refractive index vs. the concentration of DMSO. An optical fiber without the chitosan/PVA cladding is schematically illustrated over the figure.

また、類似のタイプの光ファイバセンサの例としてエバネッセント波またはクラッドモードの光の吸収によるセンサも報告されているが、本センサは測定波長が500nmであるのでクラッド膜による光吸収は無く、従ってこれらの光吸収の応答への関与は無視することが出来ると考えた。

#### 4.3.4 テフロンコーティングと応答速度

キトサン/PVAクラッド膜は実試料中の種々の成分、特にアニオン性色素を不可逆的に吸着し、センサプローブ機能の劣化が見られた。本研究ではこの劣化を防ぐため、クラッド膜にテフロン保護膜のコーティングを行った。しかし一方で、選択性や応答速度に影響を与えることが予想される。事実、Fig.4-8に示したように、各有機溶媒の応答速度はテフロン膜をコーティングすると大きく変化した。Antoineの式<sup>27)</sup>から求めた蒸気圧の高いものほど早い応答を示し、例えばアルコール類に対しての応答速度は、メタノールから1-ブタノールまで蒸気圧が減少するに従って約90秒から270秒と遅くなった。ただし、それぞれの応答量はテフロン膜がない場合とほぼ同程度の大きさを示した。テフロン膜がない場合 (Fig. 4-3) いずれも約1分以内で最大応答を示していることから、有機溶媒がテフロン膜を通過する際、気体状態で通過することを示唆し、このことは、後述するように不揮発性の共存物の影響を除くことを可能にすると思われる。

#### 4.3.5 塩素化炭化水素への応答

これまで述べたように、本センサは、より疎水的でかつ蒸気圧の高い有機物に対して高い応答を示すことが明らかになった。そこで環境分析への期待を込めて、現在問題になっている環境水中の塩素化炭化水素分析への応用を検討した。

テフロン被膜したセンサの $50 \text{ mmol dm}^{-3}$ のクロロホルムに対する応答曲線と検量線をFig. 4-9に示した。応答量は同濃度のエタノールの約10倍と高く、1,2-ジクロロエタンとtrans-1,2-ジクロロエチレンに対しても同様な応答が見られた。これらの知見はこのセンサが環境モニターへ利用出来る可能性を示すが、現在のままではクロロホルムに対する検出限界が $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  (S/N=



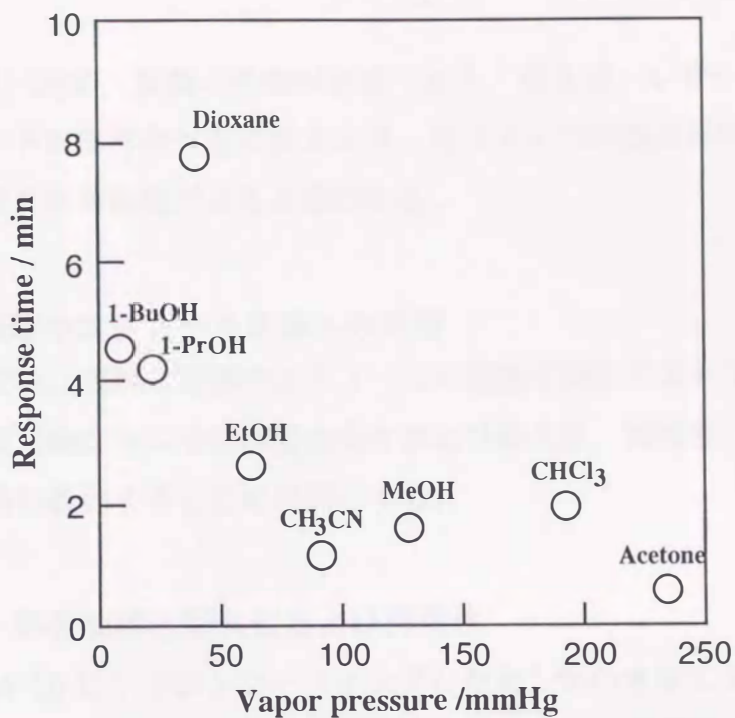


Fig. 4-8 Relationship between the response time and vapor pressure of organic solvent. The vapor pressures are at 25.0 °C and are calculated from Antoine equation. Each sample solution contains 0.5 mol dm<sup>-3</sup> of organic solvent appended beside the circle.

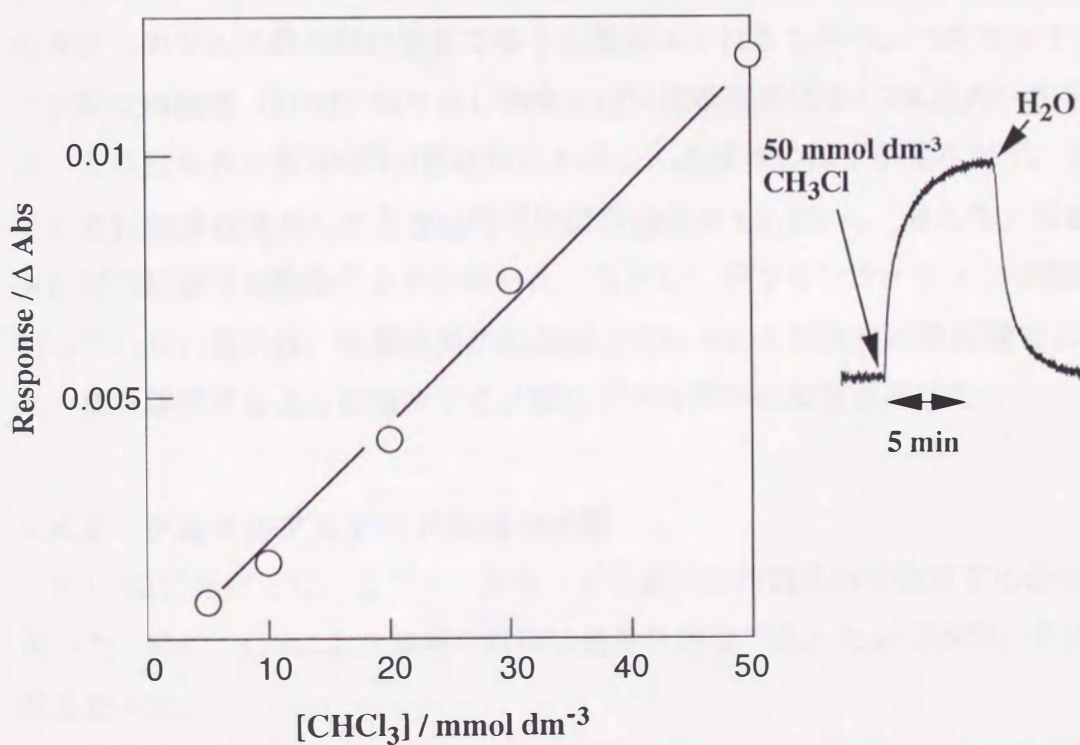


Fig. 4-9 Typical response and a calibration curve for chloroform in water.

3) と悪いため、装置の改善が必要である。例えば、レーザー光源を用いて入射光のモードを臨界角付近に揃えたり、光ファイバの感応部位を長くしたりすることで改良の可能性があると思われる。

#### 4.4 酒類中エタノール定量への応用

本節では、実際に酒類中エタノールの定量に関して本センサが使用可能かどうか、実用的なセンサの作製の条件および耐久性、再現性、共存物の影響などを具体的に検討することを目的とする。

##### 4.4.1 応答曲線と耐久性および再現性

Fig. 4-10 にテフロンコーティングしたセンサの水中エタノールへの応答を示す。セルにエタノールが導入されると約2分で一定値を保ち、水で置き換えると約5分でもとに戻った。50v/v%濃度で行った再現性と耐久性に関する検討結果をFig. 4-11 に示す。ここで、24回目までは2週間にわたって測定の度にセルを分光光度計にセットし直した場合の応答、25回から44回目まではセルをセットしたままの状態でも2週間にわたって測定し、その後45回から50回までは再び測定毎にセルをセットし直した結果である。これより、応答は分光光度計へのセルの取り付け位置で若干の差がみられるものの、一旦セットすると良好な再現性(20回の繰り返し測定の相対標準偏差は $\pm 1.7\%$ 以内)を示した。さらに6カ月間100回の測定後にもほとんど感度の低下が見られず、またその後10回連続使用したときの再現性標準偏差が $\pm 2.1\%$ と、耐久性・再現性共に実用に適用可能なことが分かった。ただし、テフロンコーティング処理を行っていないものは、応答時間が約40秒と早いものの耐久性が数週間であった。また後述するように糖やアミノ酸などの共存物の影響を受けた。

##### 4.4.2 グルタルアルデヒド架橋の効果

4.4.1項に先だって、エタノールセンサの適切な作製条件を決定する必要がある。特に、GAによる架橋の制御は重要な問題であったので本節にその結果をまとめた。

Fig. 4-12 は架橋の程度の応答への影響を調べたものである。キトサン／



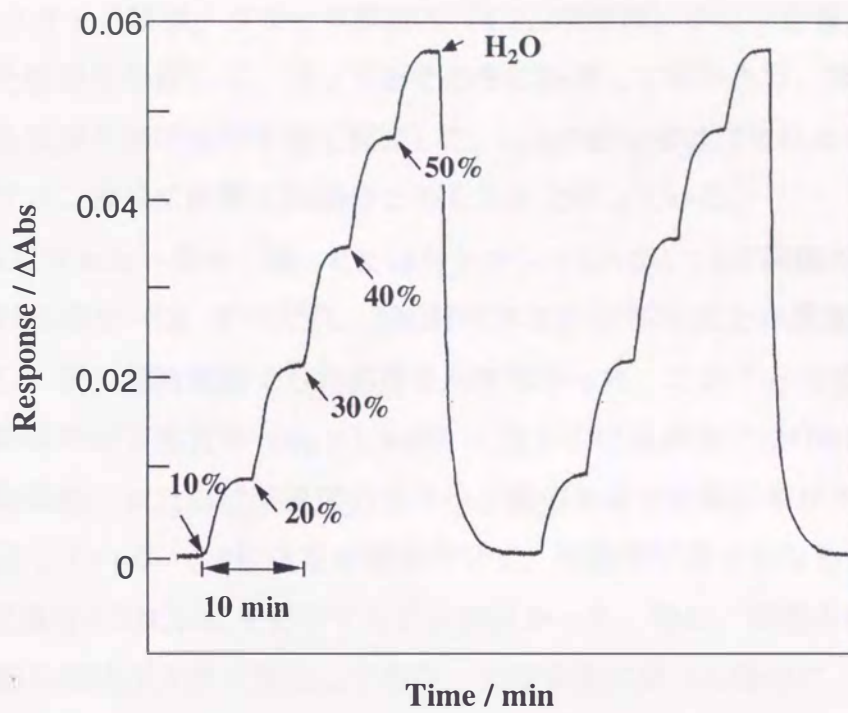


Fig. 4-10 Typical response of the sensor to ethanol. The values given in % are the ethanol concentration introduced into the cell.

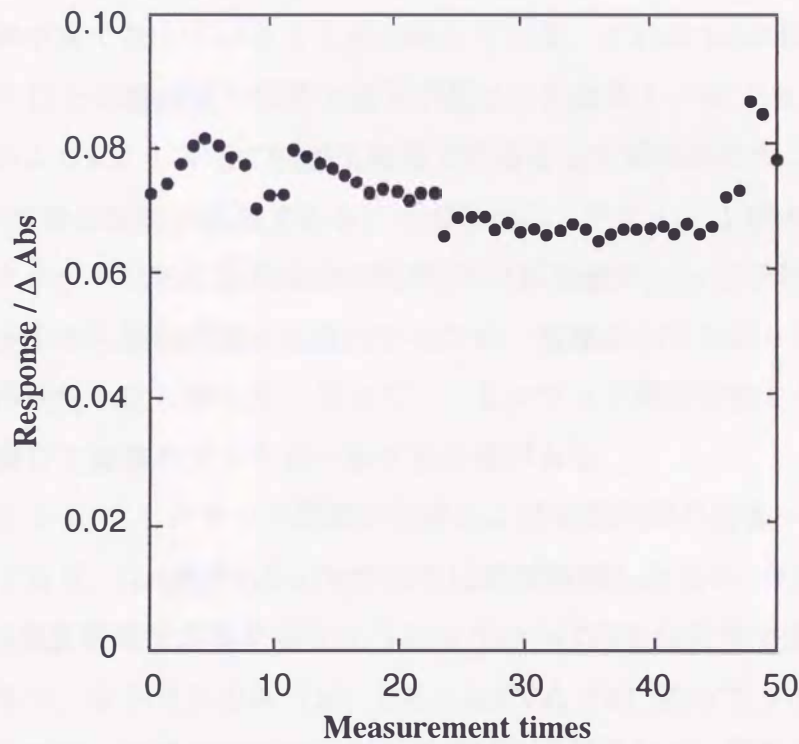


Fig. 4-11 Reproducibility and durability of the sensor. Fifty times measurements were carried out during 4 weeks for 50 v/v% of EtOH. At the 25-44th data points, the set position of the cell was left intact and at the other data points, the cell was reset for every run.

PVAクラッド膜は、クラッド原液A (4.2.2項参照) 中に一定量のGAを添加混合した溶液を準備して、ロッドをその中に浸漬して引き上げ、室温でクラッド製膜と架橋を同時進行させて調製した。GAの添加量は含まれるキトサンをグルコサミン濃度に換算した場合とのモル比で示している。

GAを含まない場合 (■) またはキトサン : GAが1 : 4で架橋の程度が低いと思われる場合 (□) それぞれ、EtOH80%または70%以上の濃度で応答が突然出現し、狭い濃度範囲でしか応答を示さなかった。このことは前述したように、応答を示す屈折率 ( $n_2 = 1.449$ ) になるのに高濃度のEtOHが必要であり、架橋無しまたは低架橋度のクラッド膜の水中での屈折率がもともと低いことを示している。GA仕込量を増加させて、架橋度が高くなるに従って (●, ○) 低濃度のEtOHにも応答することが分かった。特に、架橋の程度によって検量線の形状が大きく変化しており、工程管理に用いる場合に、目的とするEtOH濃度範囲に高い感度を示すセンサが作れる可能性があることは重要な点と思われる。また架橋が進むにつれて、高濃度側での応答の低下が見られた。これは高架橋時にはクラッドとコアの屈折率の逆転が起きるほどクラッド膜の屈折率が高くなっていることを示唆している。これは4.3.3節で述べたDMSOが90%以上の濃度域で応答の低下が起こった事実と一致する。

このように、広いEtOH濃度範囲で応答を示す実用的なセンサを作製するにはGA架橋の制御が重要であることが分かる。ただし、上述の架橋膜調製方法ではクラッド材料になる溶液の粘度がGA添加量によってそれぞれ異なり、かつ溶液中でも架橋が刻々と進行するため、膜厚のコントロールが困難であり応答の再現性も乏しかった。従って、一旦クラッド膜を作製しその後GA溶液中に浸漬して架橋をコントロールする必要がある。

Fig. 4-13は、クラッド原液の組成および架橋時間の応答への影響を示したものである。GA濃度1.6wt%で50℃12時間架橋したもの (○) は、ほぼ全EtOH濃度範囲で応答を示すようになりEtOH70%付近まで直線関係が見られた。なお、キトサンのみ (▲) あるいはPVA (▽) のみでクラッド膜を調製した場合には、同条件で架橋しても応答は全く見られず、屈折率そのものが応答範囲に入っていないことが分かる。また、クラッド膜を製膜していないもの、および石英クラッドを剥離せず残したままでは全く応答を示さなかった。本章



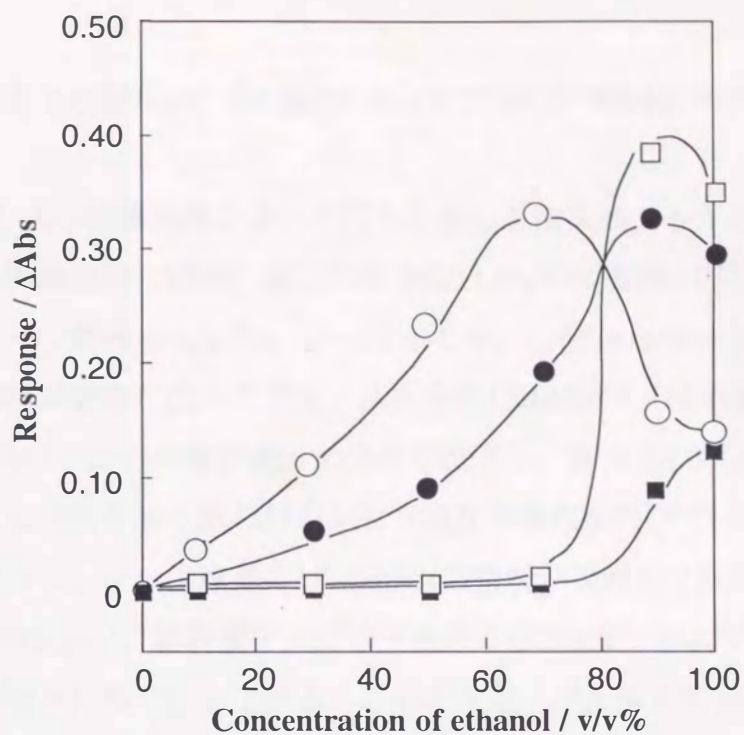


Fig. 4-12 Effect of crosslinking with GA on the response. GA was added to the chitosan/PVA stock solution prior to the coating. The molar ratios of GA to the chitosan glucosamine unit were 0:4 (■), 1:4 (□), 2:4 (●) and 3:4 (○).

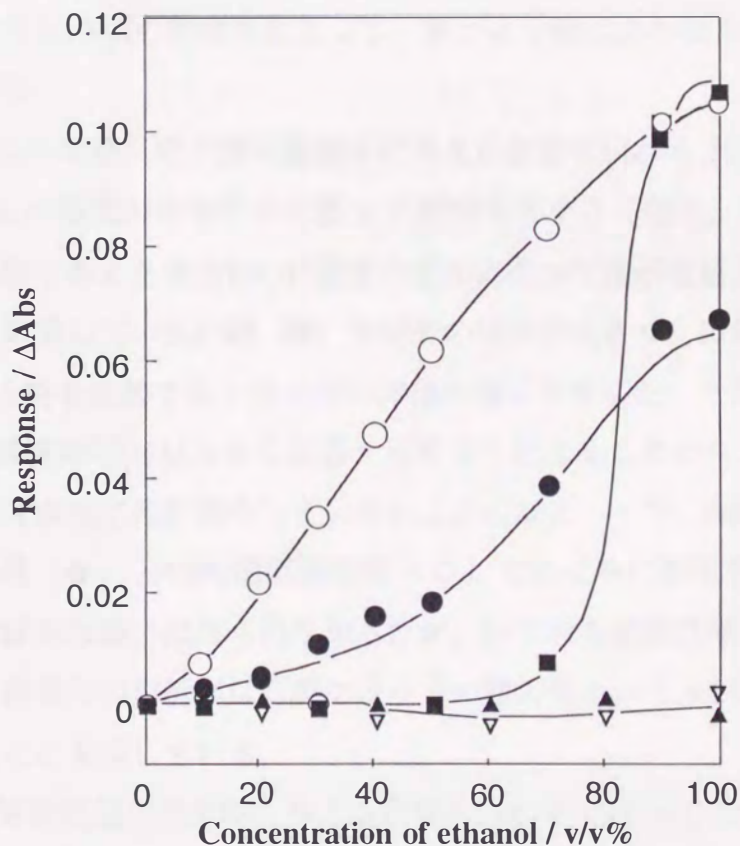


Fig. 4-13 Effect of crosslinking with GA on the response. No crosslinking (■), crosslinking with 1.6 wt% of GA at 50°C for 12 h (○) and for 5 min (●). Responses with claddings prepared with chitosan alone (▲) and with PVA alone (▽) are supplemented.

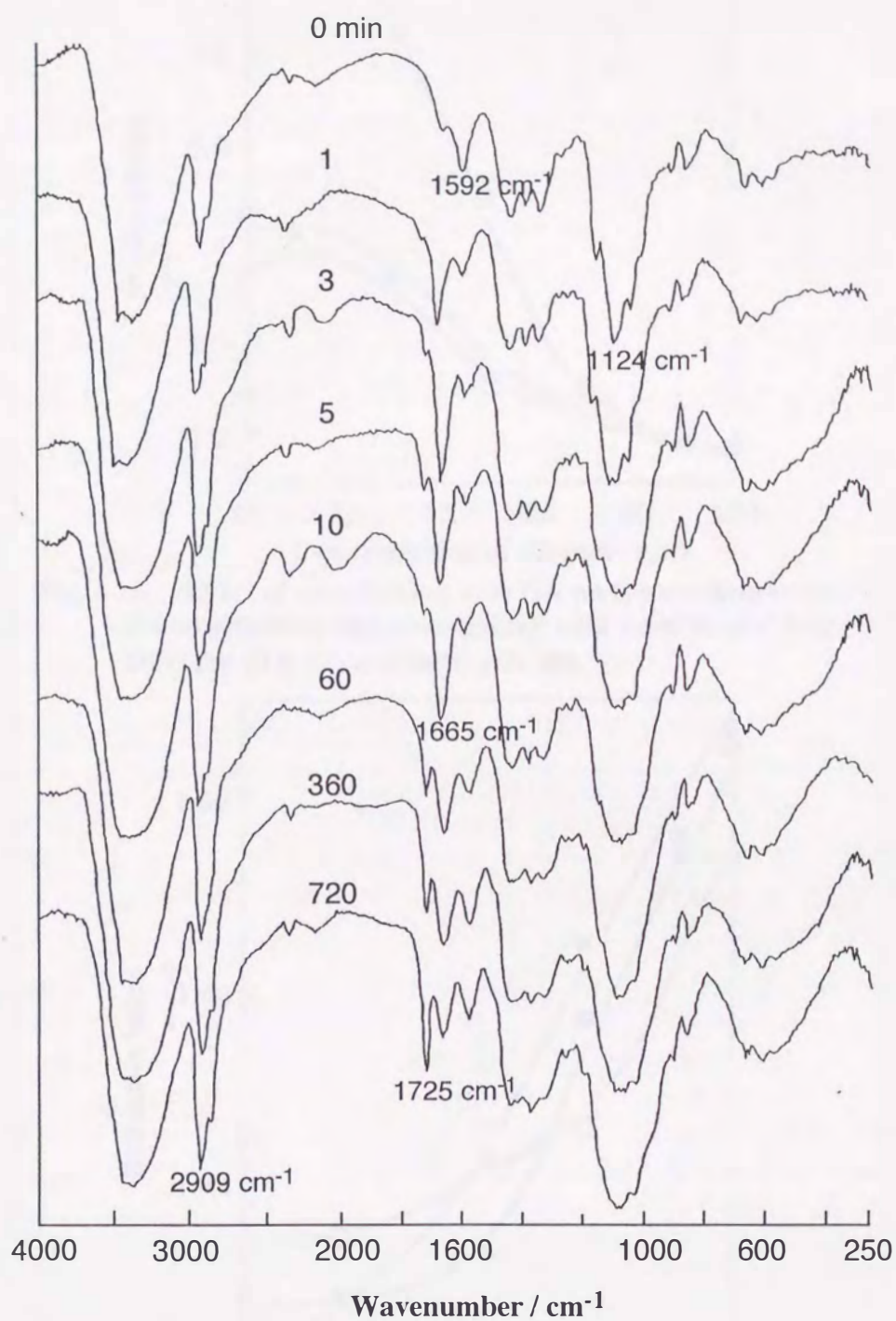
の前項までの結果は、GA濃度1.6wt%で50℃12時間架橋で得られたものである。

一方、GA架橋操作によって起こる変化をIRスペクトルにより知ることができた。IR測定用に別途作製した膜をGA1.6wt%、50℃で処理したときのIRスペクトルの経時変化をFig. 4-14に示した。1分から10分までの架橋処理の間は、架橋が進むに従ってアミノ基由来の $1592\text{cm}^{-1}$  (N-H変角振動) と  $1124\text{cm}^{-1}$  (C-N伸縮振動) の吸収が低下し、新たに $1665\text{cm}^{-1}$ 付近にC=N二重結合に由来すると思われるシッフ塩基の吸収がのびている。その後、12時間にわたって、シッフ塩基の $1665\text{cm}^{-1}$ の吸収が相対的に減少し、メチレン基由来の $2909\text{cm}^{-1}$ 、脂肪族アルデヒド由来の $1725\text{cm}^{-1}$ および、 $1100\text{cm}^{-1}$ 付近の吸収が徐々に強くなっている。このことは、グルタルアルデヒドとPVAとのアセタール形成による架橋を含めた、アルデヒド基の導入が起こっていることを示している。このことより、短時間架橋の間はキトサンのアミノ基とのシッフ塩基形成によってキトサン部位の架橋が優先的に起こっているが、処理時間が長くなるとPVAの架橋も起こって、膜がより密にまた疎水性に変質するものと思われる。

次にGA架橋処理が膜の膨潤率に与える影響をFig. 4-15に示した。いずれの膜もEtOH濃度が増加するに従って膨潤率が小さくなり、センサ中のクラッド膜の挙動を考えた場合EtOH濃度の増加に従って膜が収縮することがわかる。中でも架橋していない膜 (■) ではその傾向が大きく、EtOH100%の時と水100%の時を比較すると約2倍の体積の違いが生じた。ただし、この膜はEtOH濃度約70%以上から応答を示すようになることから、低濃度側での大きな変化は直接応答に関与していないことになる。一方、架橋膜の膨潤率は5分架橋処理 (●) と12時間架橋処理 (○) ではともに膨潤率の変化は小さく、両者で顕著な違いはみられなかったが、いずれも低濃度域から応答を示すことから水浸漬時の屈折率は石英クラッドの屈折率  $n_2 = 1.449$  に近いが、それ以上であることを示している。

GA架橋処理が屈折率に与える影響をFig. 4-16に示した。いずれの膜もEtOH濃度増加に従って屈折率が増加している。また、0%EtOHにおいて12時間架橋のものは他の2つより屈折率が高かった。しかし、例えば20%EtOHに





**Fig. 4-14** Effect of crosslinking with GA on the IR spectrum of chitosan/PVA membrane. The membrane was crosslinked with 1.6 wt% of GA at 50°C. Values on the spectra showed the crosslinking time in minutes.

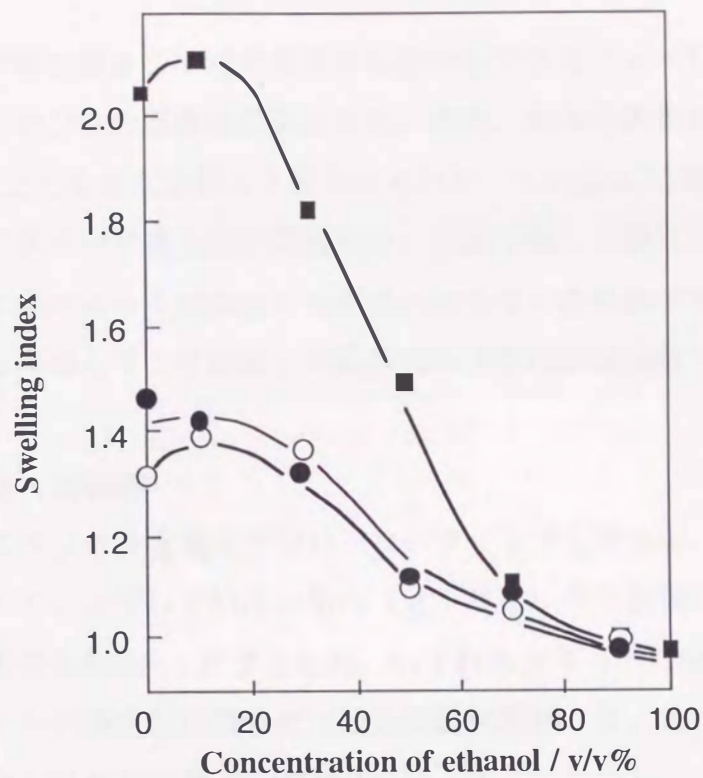


Fig. 4-15 Effect of crosslinking with GA on the swelling index. No crosslinking (■); crosslinking with 1.6wt% of GA at 50°C for 12 h (○) and for 5 min (●).

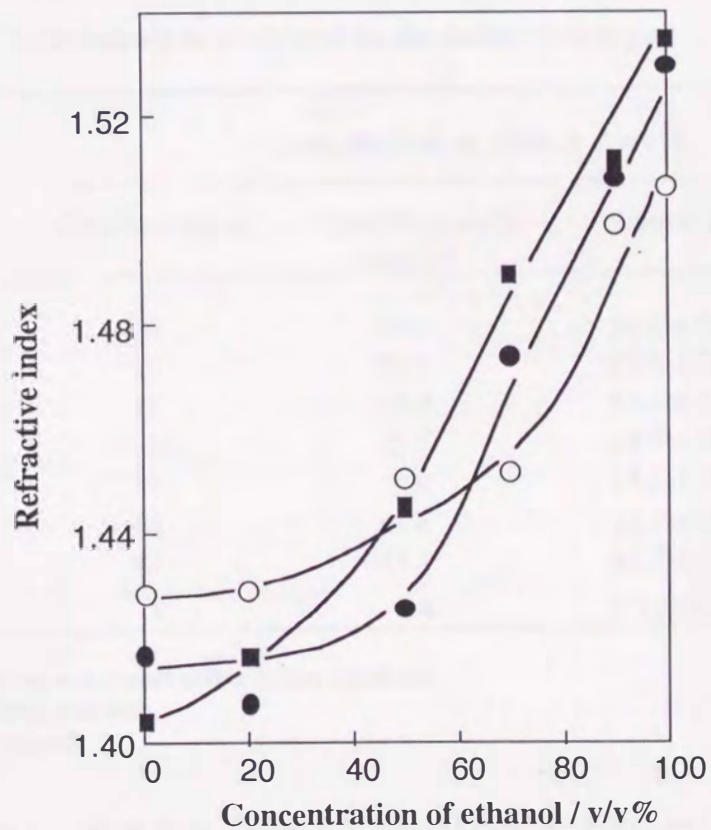


Fig. 4-16 Effect of crosslinking with GA on the refractive index. No crosslinking (■); crosslinking with 1.6 wt% of GA at 50°C for 12 h (○) and for 5 min (●).



において、屈折率の値としては応答を示し始めるであろう  $n = 1.449$  より低い値であったが、センサの応答は観測された。また、最大応答値を示すと思われる  $n = 1.460$  以上でもまだ応答の上昇がみられた。これは4.3.2節で述べたように、センサのクラッド膜と屈折率測定用に別途作製した膜には厚さに差があり、またその差によって架橋度にも差異が生じているためであり、この実験で得られた屈折率値とセンサ応答との直接的な比較検討は困難である。

#### 4.4.3 酒類への適用

酒類中のエタノール含量をテフロンコーティングしたもの（センサ1）と、テフロンコーティングしていないもの（センサ2）の2種類のセンサを用いて定量した結果をTable 4-1にまとめた。いずれもクラッドは50℃12時間GA架橋した。ビールは測定前に超音波で数分間脱気処理した。他のサンプルについては前処理なしにセルに導入した。

焼酎についてはA, B, Cとも表示値、比重法で求めた値およびセンサ1の応

**Table 4-1 Determination of ethanol in alcoholic beverages**

Alcoholic beverage	Concentration of ethanol / v/v %			
	Certified value	Specific gravity method	Sensor 1 <sup>a</sup>	Sensor 2 <sup>b</sup>
Shochu A	20	19.9	19.5 ± 0.1	20.9 ± 0.6
B	25	25.3	25.5 ± 0.4	27.1 ± 0.6
C	35	35.4	34.5 ± 0.2	37.0 ± 0.2
Sake	15-16	15.7	18.0 ± 0.7	40.7 ± 2.2
White wine	14	— <sup>c</sup>	14.2 ± 0.2	28.6 ± 3.3
Red wine	14	— <sup>c</sup>	12.7 ± 0.3	— <sup>c</sup>
Whiskey	43	43.1	42.7 ± 0.3	77.4 ± 2.1
Beer	5	4.4	5.1 ± 0.6	— <sup>c</sup>

a. The cladding was coated with a Teflon membrane.

b. The cladding was bare.

c. Not determined.

答値の間で良い一致を見た。またビールについてもほぼ一致した値が得られた。テフロンコーティングを有しないセンサ2は日本酒、ワインに対して表示

値より大きな値を示した。これらの酒類はTable 4-2に示しているように、醸造酒のため糖やアミノ酸などの不揮発性共存物を含んでおり<sup>28)</sup>、これらが応

**Table 4-2 Amounts of non-volatile coexistents in alcoholic beverages / ppm<sup>28)</sup>**

Component	Japanese sake	wine
Reducing sugar /%	2.0~4.0	0.1~0.8
Lactic acid	135~650	1000~5000
Aspartic acid	290	76
Glutamic acid	420	334
Glycine	290	12
Proline	400	531

答に関与していることが示唆される。そこでグルコース、グルタミン酸、乳酸それぞれを通常の日本酒に含まれるものと同程度に共存させてセンサ2の応答への影響を見た。Fig. 4-17に示すように全ての共存物が正の誤差を与えた。この影響はテフロンコーティングによってFig. 4-18に示すようにほぼ完全に除去できた。このことは、不揮発性の有機酸や糖に対しても本センサは応答を示すが、用いた非晶質のテフロン樹脂はプラスチック材料の中ではもっとも低い誘電率を有しているため、水溶性の不揮発性化合物のクラッドへの浸透を防いでいることを示している。そのため、テフロンコーティングによって選択的にエタノール定量が可能になったものと思われる。また、ウイスキーに対してはセンサ2は非常に大きな値を示し、しかも一回使用するとセンサの再生が困難で、共存物のクラッド膜への不可逆な吸着が起こっていることを示唆した。この欠点もテフロン膜を使用することで改善できた。したがって、テフロンコーティングは、キトサン/PVAクラッド膜への実試料中の成分の不可逆的な吸着による劣化を防ぎ、耐久性の向上と再現性の発現にも重要な役割を果たしているものと思われる。

以上のように、本センサはアルコール発酵を含む多数のアルコール製造において工程管理に実用可能なものと思われたため、特許出願し認可された<sup>29)</sup>ことを付記する。



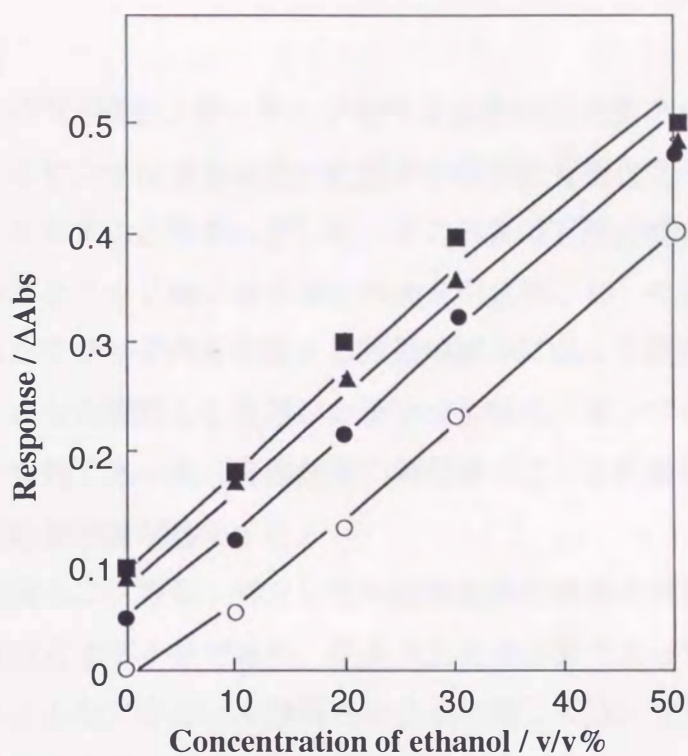


Fig. 4-17 Interferences from glucose and organic acids in the response of a sensor without Teflon coating. Each solution contains  $30 \text{ g dm}^{-3}$  of glucose ( $\blacktriangle$ ),  $0.4 \text{ g dm}^{-3}$  of glutamic acid ( $\blacksquare$ ),  $0.7 \text{ g dm}^{-3}$  of lactic acid ( $\bullet$ ) and none of the additive ( $\circ$ ).

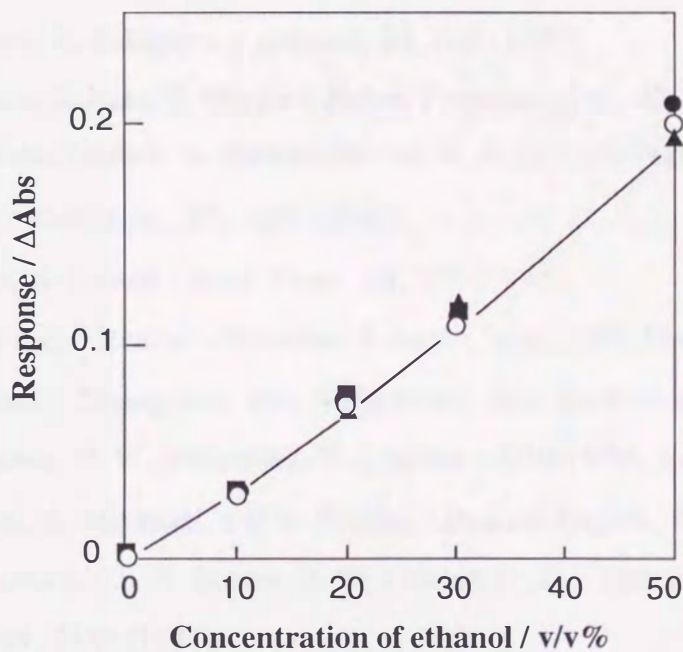


Fig. 4-18 Response of the Teflon-coated Sensor. Each solution contains  $30 \text{ g dm}^{-3}$  of glucose ( $\blacktriangle$ ),  $0.4 \text{ g dm}^{-3}$  of glutamic acid ( $\blacksquare$ ),  $0.7 \text{ g dm}^{-3}$  of lactic acid ( $\bullet$ ) and none of the additive ( $\circ$ ).

#### 4.5 総括

キトサン/PVA膜をクラッドとする内部全反射型の光ファイバセンサを考案作製した。本センサは水中に溶けた種々の揮発性有機化合物（有機溶媒）に可逆的な応答を示すことを見いだした。その応答は有機溶媒の浸透によるクラッド膜の収縮がクラッド膜の屈折率の増加を引き起こし、それによる臨界角の増加、すなわちクラッド内を伝搬する光量の減少によって説明できることを明らかにした。また保護膜として用いたテフロン膜は、センサの安定性、妨害物の除去などに有効であった。有機溶媒の誘電率が低いと応答も大きく、蒸気圧の高いものは応答速度が速かった。

一方、環境モニタ用センサとしての塩素化炭化水素の分析を試みたが、現段階では感度の点で不十分であり、改良の工夫が必要であった。

リアルタイムなアルコール分析という点に関しては、十分な耐久性、感度、および選択性を有することを示した。このことは、アルコール発酵工業などにおける行程管理へ利用できることを示している。

#### 参考文献

- 1) T. Uragami, K. Takigawa : *polymer*, **31**, 668 (1990).
- 2) T. Uragami, S. Kato, T. Miyata : *Polym. Preprints. Jpn.*, **42**, 1709 (1993).
- 3) M. J. Freiria-Gandara, A. Alvarez-Devesa, R. A. Lorenzo-Ferreira, F. Bermejo-Martinez : *Anal. Lett.*, **23**, 1939 (1990).
- 4) S. Lesage, S. Brown : *Anal. Chem.*, **66**, 572 (1994).
- 5) J. Plumacher, I. Renner : *Fresenius J. Anal. Chem.*, **347**, 129 (1993).
- 6) K. Fujiwara : *Sitzungsber. Abh. Naturforsch. Ges. Rostock*, **6**, 33 (1916).
- 7) N. R. Herron, D. W. Whitehead, V. J. Miller : *SPIE*, **990**, 37 (1988).
- 8) H. Hiroaki, A. Miyazaki, and K. Bansho : *Bunseki Kagaku*, **39**, 503 (1990).
- 9) F. P. Milanovich, S. B. Brown, B. W. Colston Jr., P. F. Daley, K. C. Langry : *Talanta*, **41**, 2189 (1994).
- 10) F. L. Dickert, S. K. Schreiner, G. R. Mages, H. Kimmel : *Anal. Chem.*, **61**, 2306 (1989).
- 11) S. M. Barnard, D. R. Walt : *Environ. Sci. Technol.*, **25**, 1301 (1991).

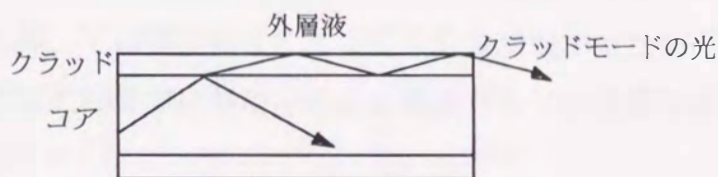


- 12) J. Burck, J.-P. Conzen, H. -J. Ache : *Fresenius J. Anal. Chem.*, **342**, 394 (1992).
- 13) J. Mayer, J. Burck, H.-J. Ache : *Fresenius J. Anal. Chem.*, **354**, 841(1996).
- 14) R. Gobel, R. Krska, S. Neal, R. Kellner : *Fresenius J. Anal. Chem.*, **350**, 514 (1994).
- 15) J. E. Walsh, B. D. MacCraith, M. Meaney, J. G. Vos, F. Regan, A. Lancia, S. Artjushenko : *Analyst*, **121**,789 (1996).
- 16) R. Gobel, M. Sengeis, R. Krska, R. Kellner : *Mikrochim. Acta [Suppl.]***14**, 829 (1997).
- 17) Y. Kitagawa, K. Kitabatake, M. Suda, H. Muramatsu, T. Ataka, A. Mori, E. Tamiya, I. Karube : *Anal. Chem.*, **63**, 2391 (1991).
- 18) Y. Kitagawa, K. Kitabatake, I. Kubo, E. Tamiya, I. Karube : *Anal. Chim. Acta*, **218**, 61 (1989).
- 19) M. Hikuma, M. Takeda, H. Matsuoka, I. Karube : *Anal. Chim. Acta*, **306**, 209 (1995).
- 20) H. Belghith, Jean L. Romette, D. Thomas : *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1001 (1987).
- 21) H. Minami, S. Ikemoto, H. Yamanishi, T. Imai : *J. Brew. Soc. Japan*, **80**, 208 (1985).
- 22) X. Xie, Ahmad A. Suleiman, George G. Guilbault, Z. Yang, Z. Sun : *Anal. Chim. Acta*, **266**, 325 (1992).
- 23) S. M. Gautier, L. J. Blum, P. R. Coulet : *J. Biolumi. Chemilumi.*, **5**, 57 (1990).
- 24) O. S. Wolfbeis, H. E. Posch : *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **332**, 255 (1988).
- 25) K. Seiler, K. Wang, M. Kuratli, W. Simon : *Anal. Chim. Acta*, **244**, 151 (1991).
- 26) K. Matsubara, S. Kawata, S. Minami : *Appl. Opt.*, **27**, 1160 (1988).
- 27) 日本化学会編：“化学便覧応用編”改訂3版, p. II-118 (1984), (丸善).
- 28) 日本化学会編：“化学便覧応用編”改訂2版, p.1390 (1973), (丸善).
- 29) 日本特許公開公報, 平7-085122, (1996).

## 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

前章でキトサン/PVA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への応答特性について考察し、クラッド膜の屈折率の変化に伴う臨界角の変化が応答を引き起こすことを明らかにした。一般にキトサンは難溶性であるが、有機酸の稀薄水溶液を用いると溶解することができる。これはキトサンのアミノ基と有機酸とで塩が形成されることにより強固なキトサンの分子間水素結合が切断されるためとされている。このように、有機酸はキトサンに対して親和性が高いため、前章で述べた光ファイバセンサの測定対象物として有機酸を検討することは興味あることである。ここで、用いたステップインデックス型光ファイバの構造を考えた場合、クラッドを取り囲む外層がクラッド自体よりも小さな屈折率を持つと、下図に示すように、光がクラッドの外側界面で内部全反射を

起こし、光が閉じこめられて伝播する、つまりクラッドモードの光の存在が知られている。このセ



ンサのクラッド膜を色素などで化学修飾した場合、分析対象物によって色の変化が引き起こされるなら前述の臨界角の変化による応答に、さらに光吸収の効果も加わるため、選択的かつ感度の高いセンサへの発展が期待できる。本章では、酸による吸収スペクトルの変化が予想される色素をクラッド膜中に固定化したセンサを作製し、その有機酸に対する応答特性を検討した。

発酵法は旧来より行われている有機酸製造方法であるが、近年の自然食品嗜好や健康食品への関心の高まりから再度注目を浴びている。そのため、大規模な連続発酵法や、有機酸回収過程などでの工程管理の必要性が新しく見直されている<sup>1,2,3)</sup>。その際、リアルタイムな有機酸の定量が工程管理やプロセスの自動化などに不可欠となってくる。

現在、有機酸の定量はガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーが主流である。食品中の有機酸定量に酵素を利用したフローインジェク



ション法<sup>4)</sup> やキャピラリー電気泳動法<sup>5)</sup> も報告されている。また、グレープジュース中に共存する有機酸の分析にイオンクロマトグラフィーと質量分析を用いて正確な同定・定量を行った報告例<sup>6)</sup> もある。これらの分析法は選択性や感度は高いがリアルタイムな分析には不向きである。

一方、若干ではあるがオンライン分析に適したいくつかの分析法が報告されている。例えば過酸化水素電極と乳酸オキシダーゼを組み合わせたニードル型の乳酸分析用酵素センサ<sup>7)</sup> や石英ハロゲンランプ光源とPbSe検出器を組み合わせた赤外分光光度計<sup>8)</sup> を用いたもの、あるいはフルオレセイン類の蛍光強度がカルボン酸によって増加する現象を利用した光ファイバ蛍光センサ<sup>9)</sup> などがある。これらの方法はバイオリアクターや生化学的なサンプル中の有機酸を前処理なしに分析できる可能性があるが、例えば、乳酸分析用酵素センサは酸素の影響を強く受けるし<sup>7)</sup>、また光ファイバ蛍光センサ<sup>9)</sup> は共存物の妨害を強く受ける欠点がある。

このように、有機酸をオンラインあるいは生体内でそのまま分析できるようなセンサやシステムの構築に関しては現在のところまだ十分な状況ではない。以上のことを考慮して本章では工程管理に利用可能な有機酸センサの作製を試み、その応答特性を検討した。

## 5.1 実験

### 5.1.1 試薬

膜の修飾に用いた色素の選択については、酸による吸収スペクトルの変化が期待できるもの、親水性の高いキトサン/PVA膜と親和性がある必要性から水溶性を示すこと、キトサン/PVA膜中のアミノ基およびヒドロキシル基と塩や水素結合を多点で形成することで膜材料ポリマー間の架橋が起こり膜の安定性が増すこと、それと同時に色素自身も安定に膜中に固定されることなどを基本に考え、芳香族部位、スルホン酸部位および水素結合部位を有する、5',5"-ジブromoピロガロールスルホフタレイン (ブromoピロガロールレッド; BPR), ピロカテコールスルホフタレイン (ピロカテコールバイオレット; PV) を選んだ。また、安定な架橋剤の役割を果たすであろう、1,2-ジヒドロキシベンゼン-3,5-ジスルホン酸 2 ナトリウム塩一水和物 (タイロン; TR), 8-ヒドロキ

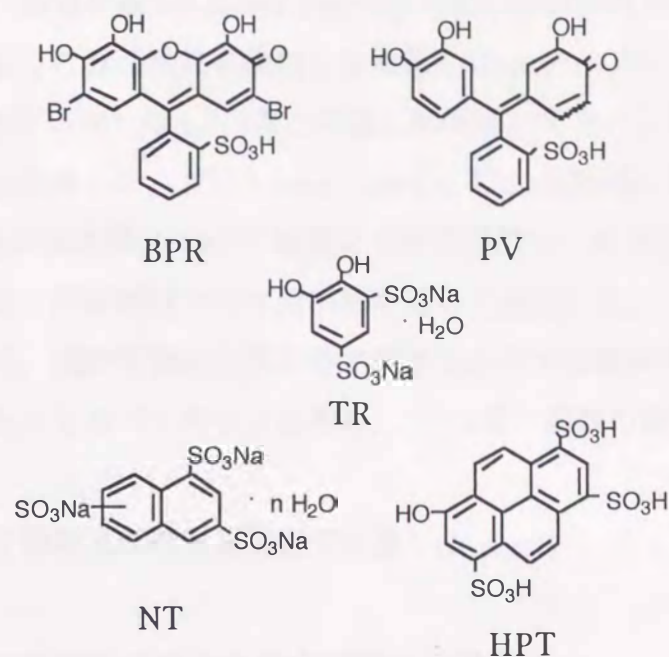


Fig. 5-1 Chemical structures of the dyes and sulfonates used in this work.

シ-1,3,6,-ピレントリスルホン酸 (HPT) および1,3,6-ナフタレントリスルホン酸三ナトリウム塩 (NT) の3種類の化合物についても比較のために検討した。以上のBPR, PV, TRは同仁化学研究所から, HPTはフナコシ株式会社, そしてNTはアルドリッチからそれぞれ購入した。これらの化学構造式をFig. 5-1に示した。有機酸は和光特級をそのまま任意の濃度に水で希釈して用いた。実試料としてのリンゴ酢, 米酢, 穀物酢, ポン酢は中埜酢店製を用いた。キトサン, PVA, テフロン樹脂, グルタルアルデヒド (GA) そのほか溶媒などセンサプローブ作製に必要な薬品類は4章で述べたものと同じである。

### 5.1.2 センサ作製と装置組立および測定手順

センサプローブは4.2.2項で述べた方法とほぼ同じ手順で作製したが, 光ファイバロッドにキトサン/PVA膜を製膜した後, まずGA架橋の条件を変えて有機酸応答に対する影響を見た。次に, GA架橋後さらに,  $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  の色素水溶液に6時間室温で浸漬し色素吸着処理を行ったプローブについて, 色素吸着の影響を検討した。その後必要な場合, テフロンコーティングも



4.2.2項と同様に行った。

装置の組立、測定手順も4.2.3項で述べた方法と同じであるが、測定波長は、後述するように波長効果を検討した結果440 nmとした。屈折率測定に用いた膜（厚さ約30  $\mu\text{m}$ ）は4.2.3項と同様に製膜後、テフロン板に挟み込んでアルカリ処理・水洗浄した、次に1.6wt%GAで5  $^{\circ}\text{C}$ 30分架橋した後、 $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ の色素水溶液50  $\text{cm}^3$ に室温で6時間浸漬し、水で付着色素を洗い流した後風乾した。屈折率はアッペ屈折計を用いて測定した。

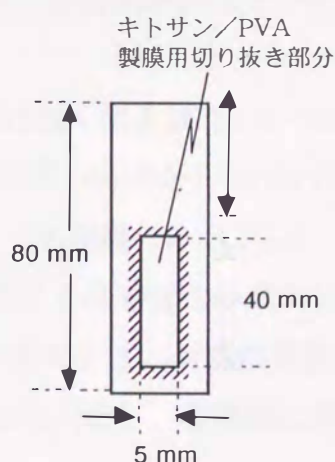
膨潤率測定は、屈折率測定と同条件で調製した色素修飾膜を約0.3mm角の断片に切ったものをカバーガラスに挟み、4.3.3項と同様の装置を用いて測定、計算した。

食酢中の全有機酸量は酸塩基滴定で定量した。

### 5.1.3 色素の吸収スペクトルおよび膜への吸着

色素の紫外可視吸収スペクトルは、それぞれ $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ の濃度の水溶液を調製後、島津UV-160Aを用いて測定した。緩衝溶液を溶媒として用いた場合、pH2.0は $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ の塩酸/塩化カリウム緩衝液を、pH4.0は $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ の酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液を、pH6.0およびpH8.0は $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ のリン酸緩衝液をそれぞれ用いた。

色素のキトサン/PVA膜への吸着量は以下の方法で測定した。まず、右図のようにOHP用フィルムを切り抜いて枠を作った。枠斜線部を紙ヤスリで傷つけて、膜がはがれにくい工夫をした後、テフロン板上に置いてキトサン2.0 mg / PVA2.0 mg を含む1 v/v%酢酸水溶液0.2  $\text{cm}^3$ を切り抜き部分および一部は斜線部に広がるように滴下して内枠一杯に広げた後、50  $^{\circ}\text{C}$ インキュベーター中で12時間乾燥製膜した。得られた膜を枠につけたまま $1.0 \text{ mol dm}^{-3}$ の水酸化ナトリウム水溶液に3時間、続いてイオン交換水に3時間浸漬洗浄後1.6wt% GA水溶液中で5  $^{\circ}\text{C}$ 30分間架橋処理した。得られた膜の厚さは約10  $\mu\text{m}$ であった。この膜を $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ の色素溶液5  $\text{cm}^3$ に



浸漬して、各時間ごとの溶液中の残存色素量から膜への吸着量を算出した。色素残存量は吸収スペクトルの吸収極大（BPR; 550nm, PV; 443 nm, TR; 291 nm, HPT; 406 nm, NT; 284 nm）における吸光度と Lambert-Beer式から求めた。

BPRを吸着させたキトサン / PVA膜の酢酸吸着による紫外可視吸収スペクトル変化は、上記OHPシート上に作製した膜を $1.0 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>のBPR水溶液に10分間浸漬し、その後水で洗浄風乾したものを5分間2～20%の酢酸水溶液に浸漬後、紫外可視分光光時計にセットして測定した。

## 5.2 結果および考察

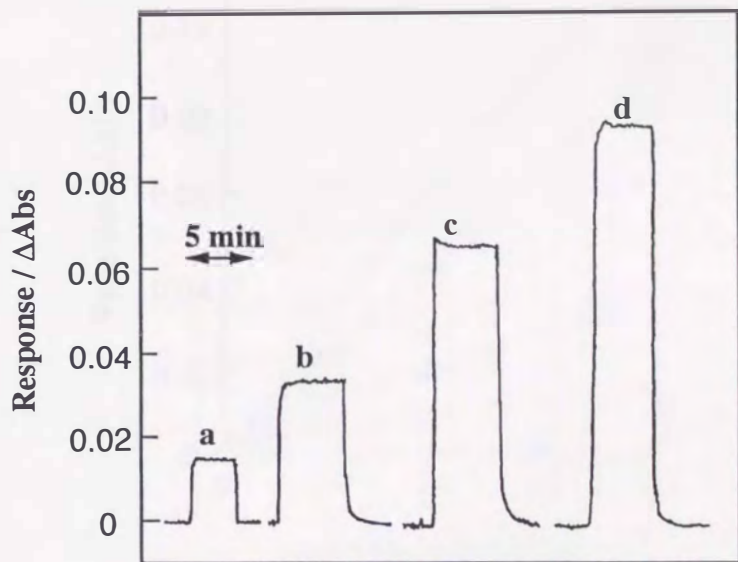
### 5.2.1 グルタルアルデヒド架橋の影響および有機酸応答選択性

まず、予備実験として4章で作製したセンサの有機酸に対する応答を測定した。ただし、用いたセンサの応答膜は、GA架橋を1.6wt%で50℃12時間行ったのみで、テフロンコーティングは行わず、また本章で主として検討する色素による処理も行っていないセンサである。Fig. 5-2に示すように蟻酸、酢酸、プロピオン酸、乳酸、いずれに対しても応答を示した。応答速度は30秒以内と速く、水をセル内に導入することにより速やかに元の位置に戻った。応答量は置換基のアルキル鎖が大きくなると大きな応答を示した。これは、4章で述べた脂肪族アルコールの場合と同様、クラッド膜中の水の排除効果が大きいと思われる。

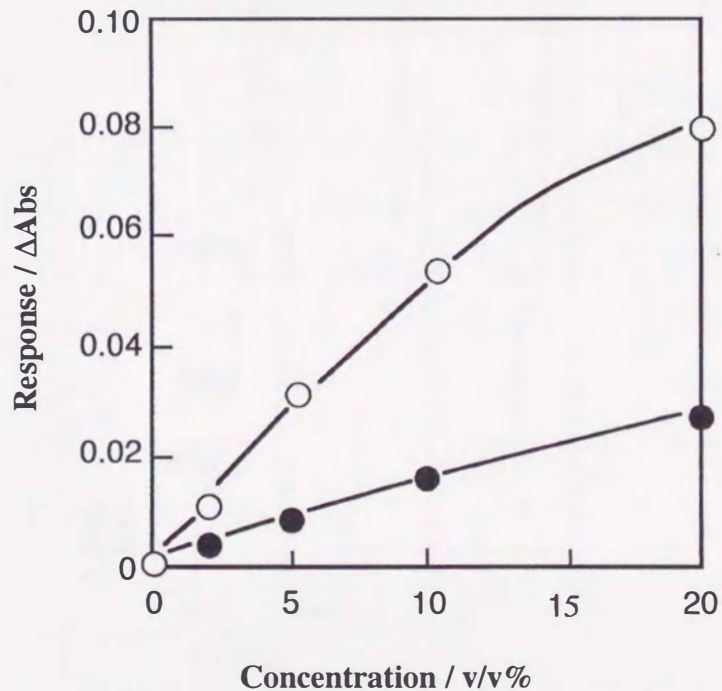
有機酸への応答はGA架橋によって大きく影響を受けた。例えばFig. 5-3に示すように、蟻酸の場合3.2wt% GAで処理した架橋度の高いものが1.6wt% GAの場合より3倍以上の大きな応答を示した。しかし、GA架橋のみのコントロールによる感度の増大は、エタノールに対しても同じく高感度化の傾向を示し（Fig. 5-4）、このことは、例えば、アルコールを原料とする有機酸発酵などではエタノールの妨害で有機酸の定量が困難なことを示唆し、有機酸に対する選択性を増加させる工夫が必要である。

以上の予備検討の結果をもとに、本章の初めに述べたように色素を吸着させたセンサの有機酸に対する応答選択性の発現を試みた。ただし、キトサンは有機酸に可溶なため膜の安定性のためにもGAによる架橋は不可欠であった。そ





**Fig. 5-2** Typical responses of the sensor to organic acids. The cladding of the sensor is without Teflon protective coating and without dye treatment. The samples are 5 v/v% of (a) formic acid, (b) acetic acid, (c) propionic acid and (d) lactic acid.



**Fig. 5-3** Responses to aqueous formic acid. The sensor probe was crosslinked with 3.2 wt% GA (O) and 1.6 wt% GA (●) at room temperature for 12h.

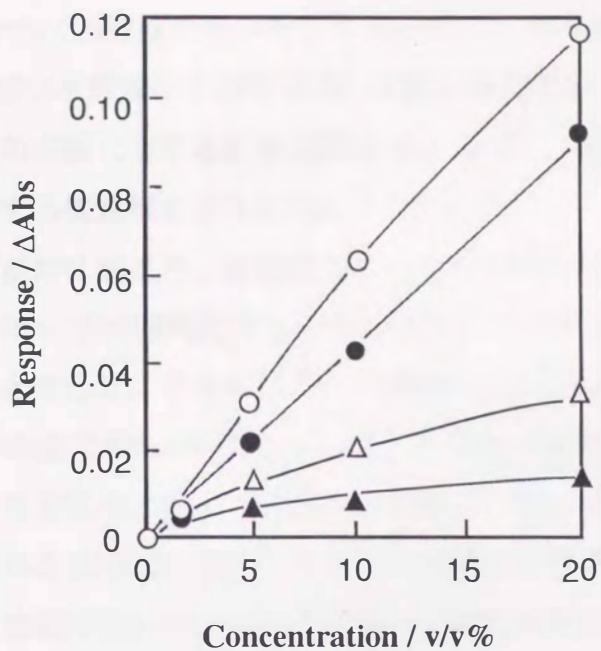


Fig. 5-4 Responses to aqueous acetic acid (○,△) and EtOH (●,▲). The sensor probe was crosslinked with 1.6 wt% GA at room temperature for 20h (○, ●) and 6h (△, ▲).

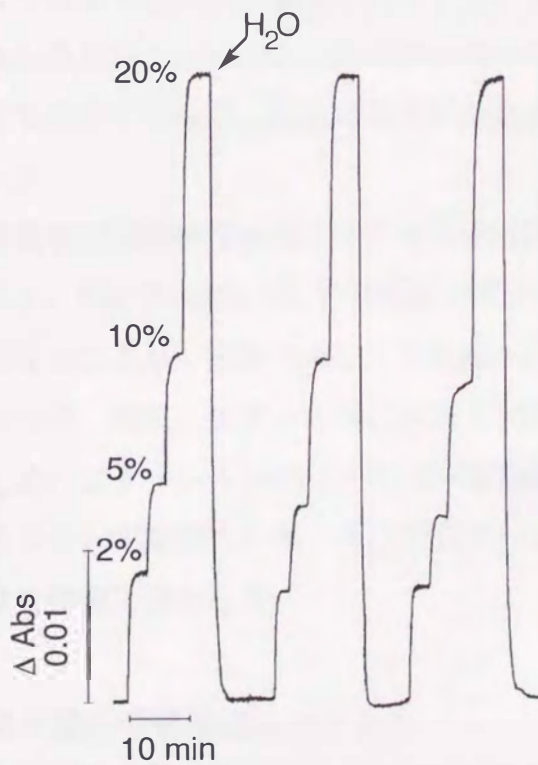


Fig. 5-5 Typical responses of the sensor upon successive introduction of various concentrations of acetic acid into the cell. The arrow indicates the admittance of water.



ここで、1.6wt% GA濃度を用いた5℃30分間の処理で弱く架橋した後、 $1 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> BPR水溶液に6時間浸漬して膜の修飾を行ったセンサを作製した。このセンサの酢酸に対する応答曲線を Fig. 5-5に、またその時の検量線をエタノールに対する検量線とともに Fig. 5-6に示す。

応答は可逆的に起こり、正逆応答ともに応答時間は約30秒であった。また、1週間にわたって50回測定後も初めの測定値の75%を保ち (Fig. 5-7) , かなり安定なことを示す。さらに、5v/v%酢酸に対する応答の相対標準偏差は初めの10回の測定で約5.6%であったが、41から50回測定までの10回分の相対標準偏差は2%であり、徐々に安定な応答を示していることが分かる。これは膜へ取り込まれたBPRは、後述するように架橋によりかなり安定な形で存在しており、弱く物理吸着しているBPRの流出が測定初期に起こった後は再現性あるデータが得られていることを示す。さらに、同クラッドをテフロンコーティングしたものは1週間100回測定後も初めの95%の応答を保ち耐久性が向上した。ただし、その場合、応答量はあまり影響を受けなかったが、応答速度が約5分と遅くなり前章で述べた有機溶媒に対するテフロン膜の効果と同様の傾向が酢酸の場合も見られた。さらに、テフロンコーティングは5.2.9節で述べるように実試料を分析する際の、無機酸類や不揮発性の共存物の妨害を除くのにも有効であった。

一方、色素吸着が有機酸選択性に与える効果は Fig. 5-4と Fig. 5-6を比較することで分かる。Fig. 5-6はGAによる架橋の度合いが低いため全体的に応答感度の低下が見られるが、BPR修飾により酢酸への応答選択性が大幅に増加することが分かった。特に、エタノール10%以下ではほとんど酢酸に選択的な応答を示したため、エタノールを原料とする酢酸発酵など実際の工程管理への利用が可能になることが期待された。そこで以下の項に述べるように色素による膜修飾の効果を詳細に検討した。

### 5.2.2 色素の紫外可視吸収スペクトル

検討した5種類の色素の吸収スペクトルを Fig. 5-8に示した。それぞれ、濃度が $1.0 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>の水溶液である。BPRは $pK_{a2} = 4.39$ の酸解離定数を有することが知られており、Fig. 5-9aに示すようにpHの低下により558nm吸収

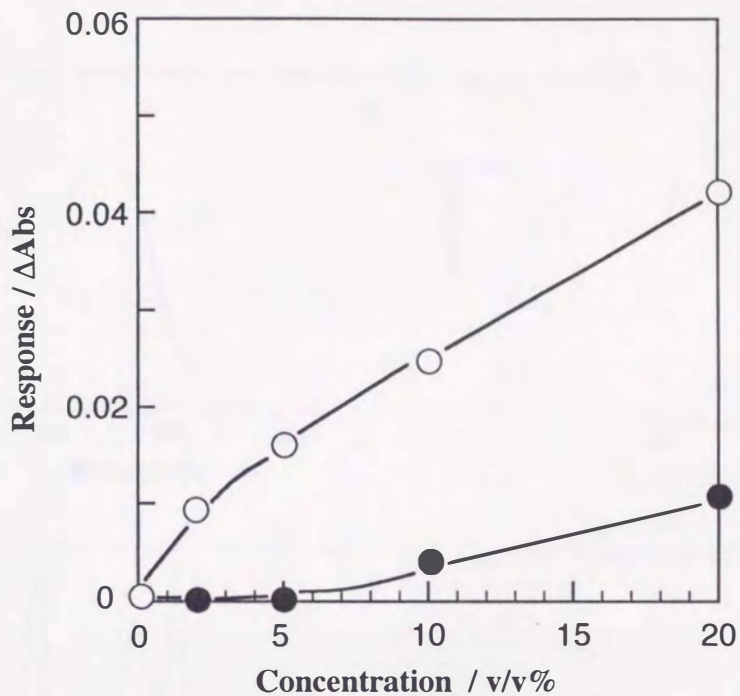


Fig. 5-6 Calibration curves for acetic acid (○) and ethanol (●). The cladding of the sensor was crosslinked with 1.6 wt% GA at 5°C for 30 min and successively treated with  $1.0 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> of BPR for 6 h.

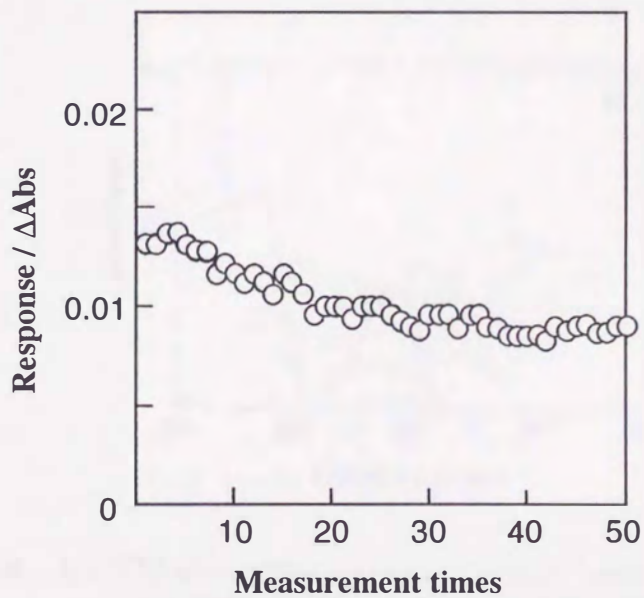


Fig. 5-7 Response reproducibility and durability of sensor cladding to 5 v/v% AcOH.



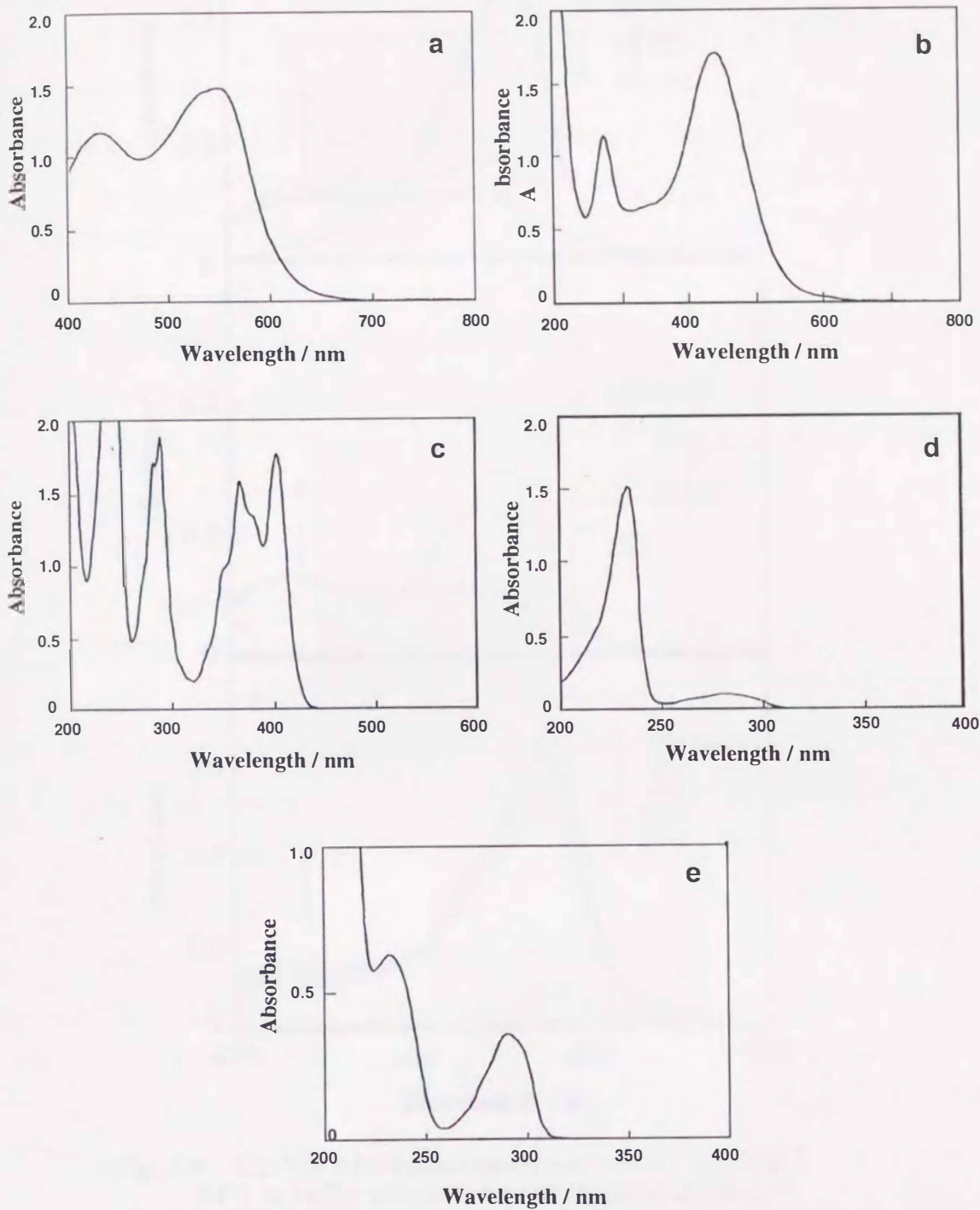
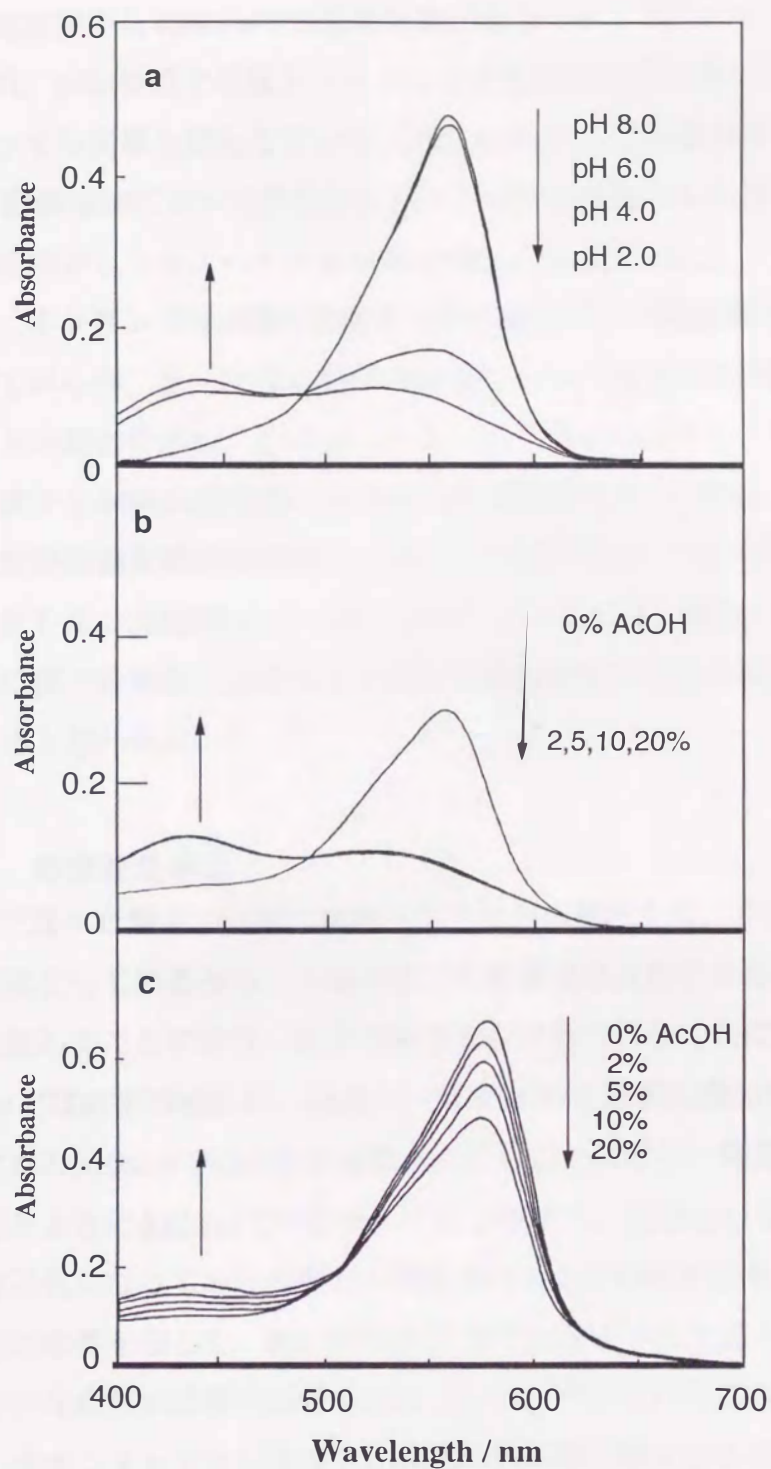


Fig. 5-8 UV/VIS absorption spectra of  $1.0 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  of aqueous (a) BPR, (b) PV, (c) HPT, (d) NT and (e) TR.



**Fig. 5-9** UV/VIS Absorption spectra of  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  BPR in buffer solutions (a) and aqueous acetic acid solutions (b), and of a BPR-modified chitosan/PVA membrane after 5-min dipping in aqueous acetic acid solution (c).



帯の吸光度減少と438nmでの吸収増加が起こった。また、476nmに等吸収点が見られ、pKa付近で吸収スペクトルの大きな変化を引き起こした。酢酸の添加によっても同様な変化を示した (Fig. 5-9b)。この場合は予想されるように2%の酢酸添加によって急激なスペクトル変化を起こした後は、2~20%と添加量を増やしてもスペクトルの変化は起こらなかった。

一方、キトサン/PVA膜に吸着させた状態のBPRは吸収極大が若干レッドシフトしているが、2~20%の酢酸の添加によって溶液中と同様ゆっくりとしたスペクトル変化を示し、この場合510nmに等吸収点を有し、575nm吸収帯の吸光度減少と440nm吸収帯の吸光度増加が観測された (Fig. 5-9c)。ただし、この酢酸濃度範囲の溶液のpHは2.7~2.0であり、均一溶液中のBPRの吸収スペクトルのpH変化とは一致しなかった。これは、酢酸の膜への取り込みと同時に膜中のキトサンのアミノ基との酸塩基反応による塩の形成が起こっているためと思われる。

### 5.2.3 検出波長特性

前項で述べた酸によるBPR吸収スペクトルの変化から、クラッドモードの光吸収が起こっているなら、4章で述べた臨界角の変化による応答に、光吸収の効果も加わることになり、応答の波長依存が見られることになる。その場合575nmでは応答の減少が、440nmで検出すると応答の増加が観測され、また等吸収点の510nmでは応答が観測されないことになる。測定の結果Fig. 5-10に示したように440nmでの応答がもっとも高く、510nm、575nmと長波長になるほど低くなっており光吸収の効果があるように思われるが、全ての検出波長で正の応答を示した。特に575nmで正の応答を示したことは、クラッドモードの光吸収の応答への寄与はあってもわずかということを示唆する。その場合、本センサも主としてクラッド膜の屈折率の変化が応答に関与していることになる。

前章の応答原理に従うならば、第一にセンサに用いたクラッド膜の屈折率が石英クラッドの屈折率 $n_2=1.449$ 付近にあること、つまり、BPRの修飾により、応答を示す範囲までクラッドの屈折率が増加していることが必要である。このことは、弱いGA架橋だけおこなって、BPR吸着処理をしていないセンサで

は、ほとんど応答を示さなかったこと (Fig.5-10 (■)) から支持される。第二に、有機酸によってさらにクラッドの屈折率の増加が1.449から1.460の範囲内で引き起こされていることの2点である。

BPRは水素結合可能な3個のフェノール性ヒドロキシル基と静電的相互作用が可能な1個のスルホン酸基を有している。このことは、クラッド膜のキトサン/PVAのアミノ基やヒドロキシル基とのイオン結合および水素結合を通して、BPRがこれらのポリマーを架橋出来ることを示しており、そのことが膜の屈折率の増加を引き起こしていると考えられる。また、Fig. 5-6で示したように、エタノールに比較して酢酸に対する応答が非常に大きかったことは、おそらく、酢酸とキトサンのアミノ基との塩形成が屈折率の増加を引き起こしているであろう。またそのことが、BPRとキトサンアミノ基との水素結合の切断をも引き起こしており、これらの作用が酢酸へのより強い応答を引き起こしていると考えられる。これらのことをBPR以外の色素も含めて以下の節でさらに検討した。

#### 5.2.4 色素の構造と応答の関係

前項で述べた有機酸への応答機構の妥当性を、BPR以外にPV, HPT, NT, TRも用いてさらに検討した。Fig. 5-11は、それぞれの色素の吸着時間を変えて作製したセンサの5v/v%酢酸に対する応答である。BPRと同じく1個のスルホン酸基と3個のヒドロキシル基を有するPVでクラッド膜を修飾した場合、BPRの場合と同じように大きな応答を与えた。一方、HPT, NTを吸着させたものは弱い応答しか示さず、吸着時間が3時間以上に長くなると逆に応答が低下した。これは、クラッド膜の屈折率がコアのそれよりも高くなったときに観測される現象で強い架橋が起こっていることを示唆する。これは、HPT, NTは3個のスルホン酸基を有しているため、クラッドのアミノ基と3点でのイオン結合による強固な架橋を形成し得ることと矛盾しない。またそのようなクラッドでは、酢酸との塩形成も困難になることも応答が弱い原因の一つになっているのであろう。また、TRで処理したセンサは全く応答を示さなかった。これは、スルホン酸基を二つ有するので十分膜中に取り込まれる可能性はあるが、ベンゼン環が一つという構造のため、膜中に取り込まれても疎水的



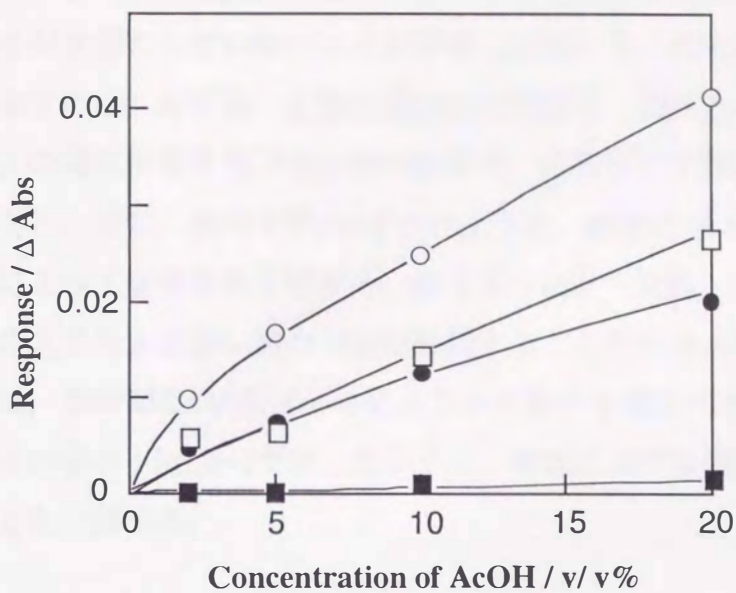


Fig. 5-10 Responses to acetic acid at 440 (○), 510 (□) and 575 nm (●). A curve represented by ■ is the response at 440 nm of a sensor having no dye.

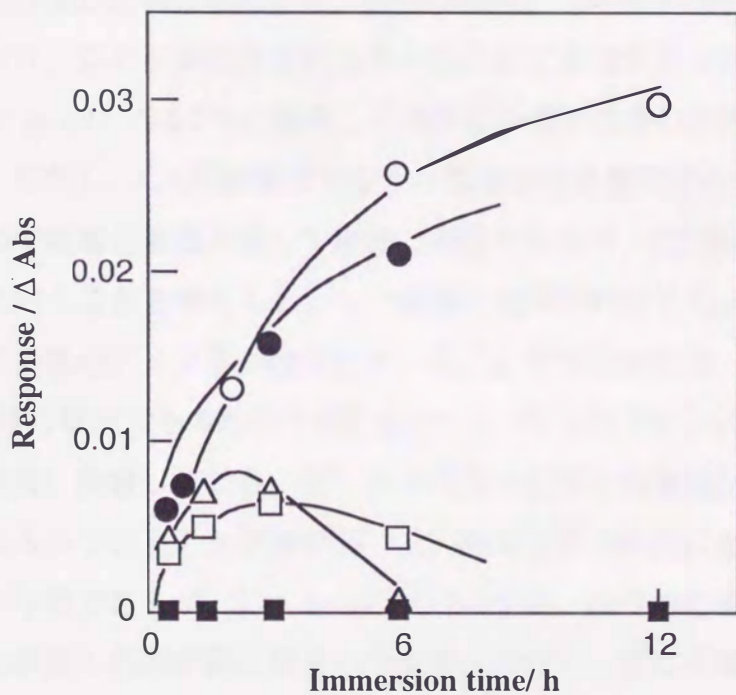


Fig. 5-11 Plots of the response to 5 v/v% acetic acid vs. immersion time. The cladding was immersed in an aqueous solution of  $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  BPR (○), PV (●), NT (□), HPT (Δ) or TR (■).

な効果が他の色素と比べて弱く、応答を示す屈折率域に達するほどの膜構造の変化を引き起こしていないことが原因と思われる。以上のことから、大きな応答を示すには、まず第一に架橋部位となりうる二個以上の官能基およびある程度以上の疎水部位をもつ化合物の吸着が、応答を示す領域まで屈折率を増加させること、次に、BPRやPVの場合のように、酢酸とキトサンが塩を形成することによって切断される程度の、例えばフェノール性ヒドロキシル基との水素結合のようなより弱い結合で修飾架橋することが必要と思われる。このような現象は、長時間のGA処理のみによる共有結合を通した強い架橋では発現しえず、その場合 Fig. 5-4で示したように、酢酸に対する選択性が見られなかったこととも一致する。

#### 5.2.5 膜への色素吸着量

Fig. 5-12にクラッド膜に色素を吸着させた場合の、浸漬時間と膜への色素吸着量の関係を示した。用いた膜は実験の項で述べたようにOHPシート枠に別途作製したものを用いた。BPRの場合、6時間処理後に約 $0.47\mu\text{mol}$  吸着しており、これは膜に含まれるキトサンのグルコサミンユニット換算モル数（ $11.2\mu\text{mol}$ ）の4.2%に相当し、非常に少量の吸着しか行われていないことを示す。ただし、GA架橋操作でシッフ塩基形成に使用されたアミノ基の量が不明なので吸着色素量に関して評価は困難であるが、GA架橋の条件が $5^\circ\text{C}$ 、30分間ということを考えてシッフ塩基に使用されたアミノ基は少量でまだ膜中には相当量のアミノ基が残存していることが予想される。また、一番吸着量の低いNTの場合でも6時間で約 $0.32\mu\text{mol}$ （グルコサミンユニットモル数の2.9%に相当）吸着しており、用いた5種類の色素の吸着量はおおよそ3~4%の範囲に入っていることが分かる。この微妙な差が応答にどのように影響しているのか不明であるが、Fig. 5-11で示したNT、HPTの応答の低下はBPR、PVよりも多量の色素が膜に吸着した結果ではなく、逆に吸着量は少ないが強固な結合で膜を架橋している結果であることを示している。また、応答を全く示さなかったTR（Fig. 5-11（■））の場合も色素の吸着が起こっていないことが原因ではなく、屈折率の増加を引き起こすような構造をしていないためと考える方が妥当である。



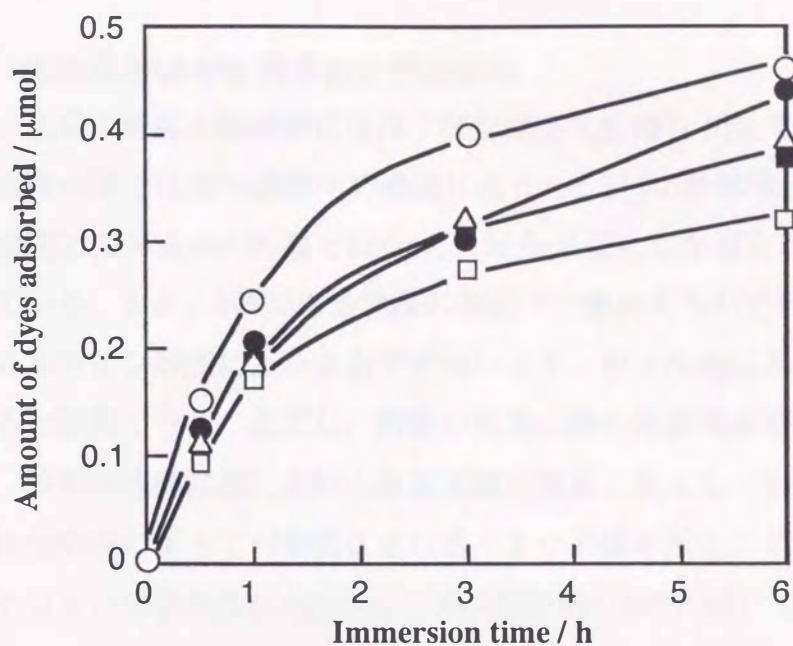


Fig. 5-12 Plots of immersion time vs. the amount of dyes adsorbed on the chitosan/PVA membrane. The membrane was immersed in an aqueous solution of  $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  BPR(○), PV(●), HPT(△), TR(■) or NT(□).

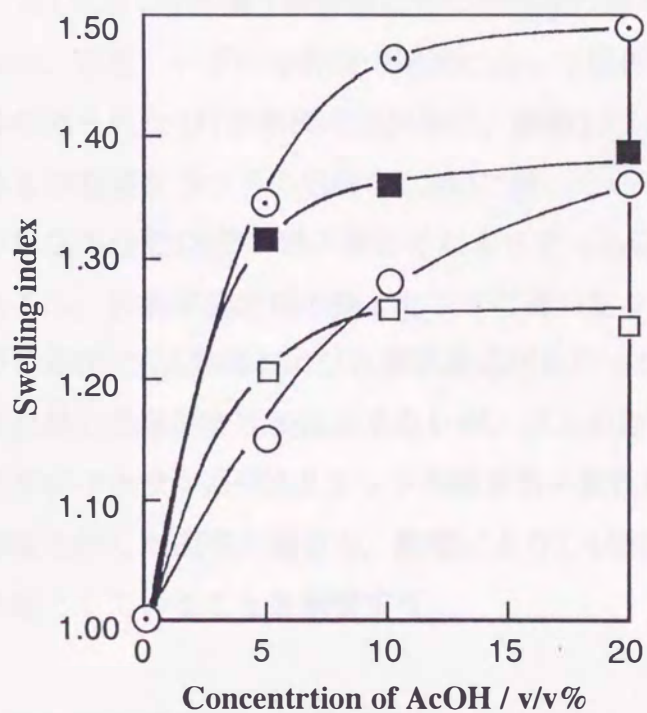


Fig. 5-13 Plots of swelling index vs. the concentration of AcOH. The membrane was treated with TR (■), BPR (○), and NT (□). The symbol ⊙ represents values obtained with a membrane without dye.

### 5.2.6 色素吸着膜の膨潤率および屈折率

次に、色素吸着膜の膨潤率に及ぼす酢酸濃度の影響を Fig. 5-13に示した。色素未処理の膜では20%酢酸への浸漬により約1.5倍の体積増加が見られたが色素処理膜では同濃度の酢酸で1.2から1.35倍の増加しか見られず、膨潤が抑えられている。また、NTでの処理膜の膨潤が一番抑えられているが、これは3個のスルホン酸基による3点での強いイオン相互作用による架橋効果のためであると解釈できる。ただし、酢酸の浸透は膜の体積増加を引き起こしている点が、前章の有機溶媒における体積収縮の現象と異なる。本センサが応答を示すには分析物によって引き起こされるクラッド膜の屈折率が、特定の範囲（石英クラッドの屈折率1.449からコアの屈折率1.460の間）で増加することの必要性を前章で明らかにしたが、膜体積の増加・減少に関わらず有機酸の場合についても屈折率増加が起こっているのかを次の実験で検討した。

Fig. 5-14はNTとTRを吸着させたキトサン/PVA膜の酢酸による屈折率の変化である。BPRとPVについては膜の色が濃すぎて屈折率の測定が不可能であった。NT(□)、TR(■)修飾膜ともに未処理の膜(●)よりも屈折率の増加が見られた。また、いずれも酢酸の増加によって屈折率の上昇が観測された。弱い応答の見られたNT修飾膜の屈折率は、酢酸10%以上の溶液に浸漬した場合ではあるが石英クラッドの屈折率1.449に届いている。しかし、ほとんど応答が見られなかったTR修飾膜の場合それよりずっと低い値しか示さなかった。もちろん、屈折率測定用の膜とセンサに用いたクラッド膜とでは膜厚が異なり、同じ操作でGA架橋および色素吸着処理を行ったとしても、架橋度が異なるため数値の直接的な比較は出来ないが、以上の結果は本センサの有機酸に対する応答がキトサン/PVAクラッドの臨界角の変化に起因しており、同様に大きな応答を示したBPRの場合も、酢酸により1.449以上の屈折率の大きな増加を引き起こしていることを示唆する。

### 5.2.7 テフロン保護膜と応答速度

テフロン保護膜を有するセンサの応答速度は1次式に従い、有機酸の炭素数が増加するに従い遅くなる傾向があった。例えば酢酸の場合、応答が一定に



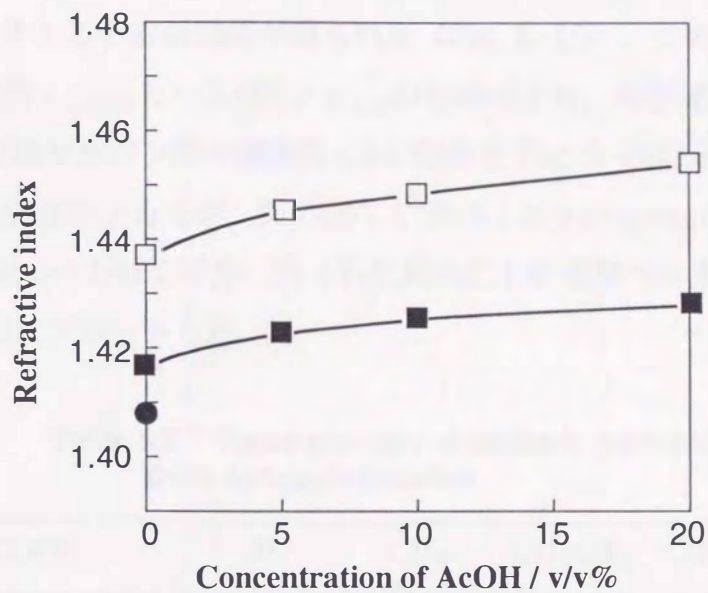


Fig. 5-14 Plots of the refractive indices of chitosan/PVA membranes modified with NT (□) and TR (■) vs. the concentration of acetic acid. The refractive index of the unmodified membrane was marked with ●.

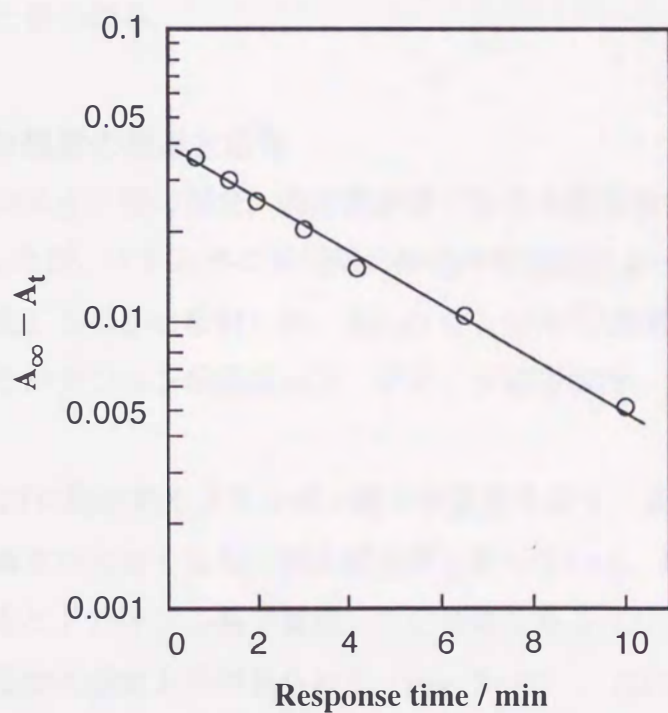


Fig. 5-15 Semilogarithmic plot of the response time vs.  $A_{\infty} - A_t$ .

なったときの吸光度 $A_{\infty}$ と時間  $t$  における吸光度 $A_t$  の差を時間に対して片対数プロットをとると直線関係が得られた (Fig. 5-15) . このプロットから得られる半減期  $t_{1/2}$  と  $k = 0.693 / t_{1/2}$  の関係式より, 応答速度定数として  $k$  を得た. 脂肪族カルボン酸の炭素数と  $k$  の関係を Fig. 5-16 に示す. また, 測定に用いた脂肪族モノカルボン酸の25℃における蒸気圧をAntoineの式<sup>10)</sup> から計算しTable 5-1の値を得た. 得られた蒸気圧と有機酸の炭素数の関係も同じく Fig. 5-16 にプロットした.

**Table 5-1 Vapor pressure of aliphatic acids calculated from Antoine's equation**

R-COOH	H-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -
Vapor pressure (mmHg)	42.8	15.5	3.45	0.80

応答速度と有機酸の蒸気圧は炭素数の増加とともに同様の傾向で減少している. このことは, 有機酸の場合も前章で述べた有機溶媒と同じようにガス状態でテフロン膜を通過しており, センサ応答速度はテフロン膜透過速度に依存しているものと思われる.

### 5.2.8 有機酸の構造と応答

脂肪族カルボン酸の場合, 炭素数が多くなると応答量が増加することをFig. 5-2で示したが, それ以外に有機酸の構造や官能基によって, 応答にどのような違いが生じるのかを検討した. 用いたセンサはGA架橋およびBPR吸着は行っているがテフロン保護膜のコーティング処理は行っていないものを使用した.

Fig. 5-17に脂肪族モノカルボン酸の検量線を示す. 炭素数の増加によって検量線の傾きが大きくなり, 検出感度が上昇している. 酢酸, プロピオン酸の水素原子をヒドロキシル基で置換した化合物であるグリコール酸, 乳酸ではそれぞれ同程度の感度上昇が見られた (Fig. 5-18) . これはヒドロキシ酸では付加的なヒドロキシル基とクラッド膜との水素結合を通してより強く取り込ま



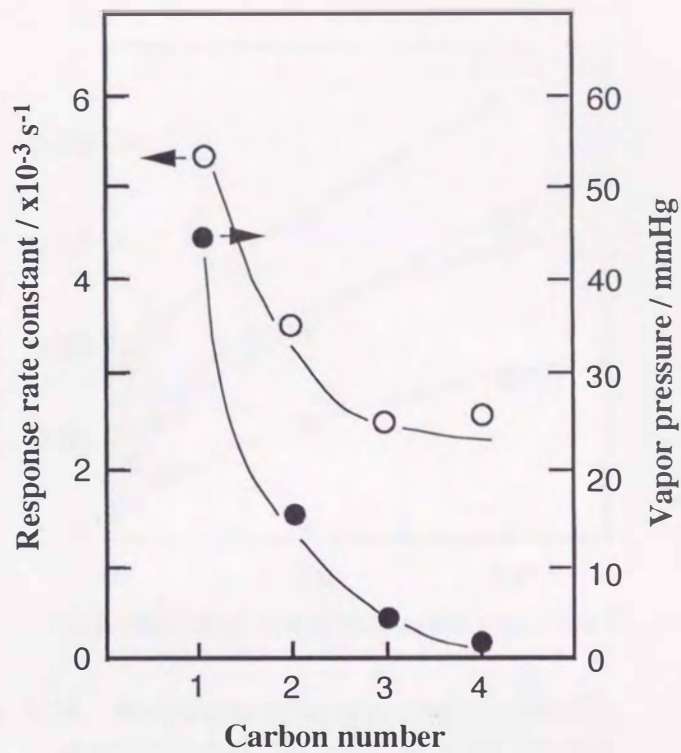


Fig. 5-16 Plots of the response rate constant (O) and the vapor pressure of aliphatic acids (●) vs. the carbon number.

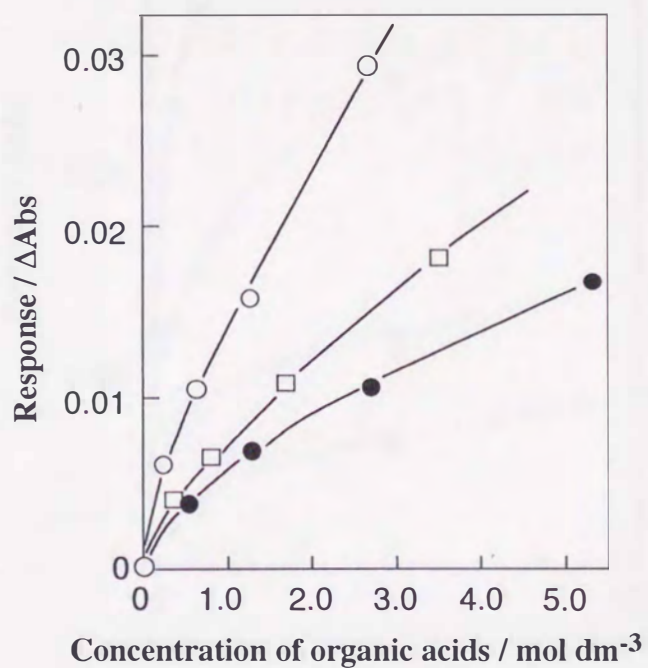


Fig. 5-17 Responses to aqueous formic acid (●), acetic acid (□) and propionic acid (O).

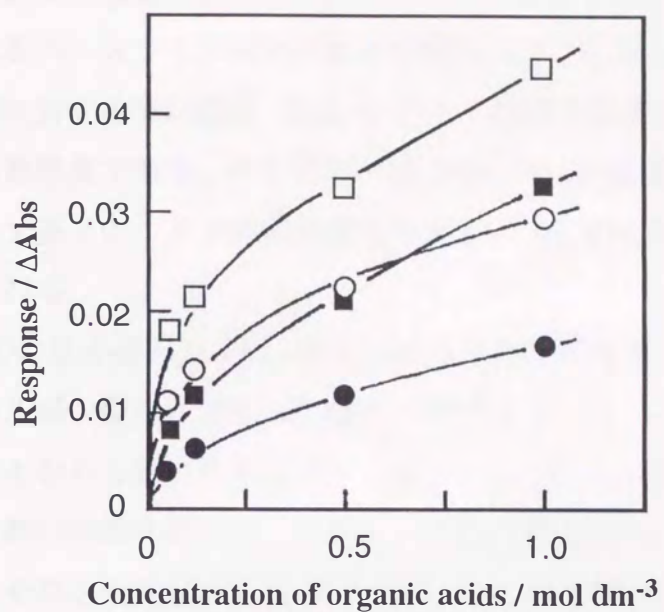


Fig. 5-18 Responses to aqueous lactic acid (□), propionic acid (■), glycolic acid (○) and acetic acid (●).

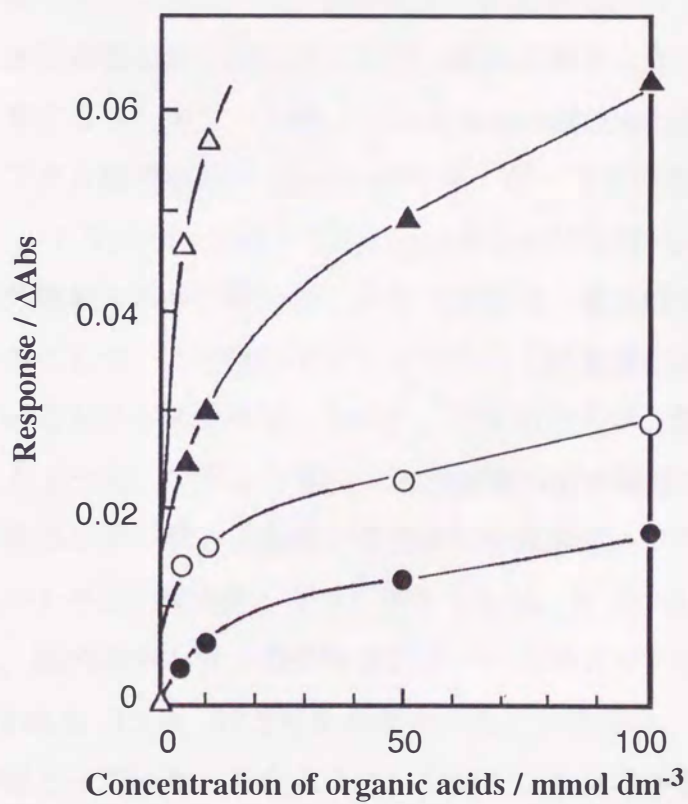


Fig. 5-19 Responses to aqueous oxalacetic acid (Δ), glyoxylic acid (▲), glycolic acid (○) and acetic acid (●).



れ、これが応答の感度向上を引き起こしていることを示す。ヒドロキシ酸の場合、水によるベースライン再生の速度が遅かったこともこのことを支持している。ケト酸に対する強い応答 (Fig. 5-19) も同様な解釈が成り立つが、この場合さらに高感度であり、ケト基が水素結合の水素受容体として働くほか、キトサンアミノ基とのイミノ結合形成などもう一つの架橋因子が関与していることも考えられる。

Fig. 5-20には多価のカルボン酸に対する応答挙動を示した。いずれも1価の脂肪族カルボン酸に比べて1000倍近い感度を示した。なかでも、構造から予想されるとおり3個のカルボキシル基とヒドロキシル基を合わせ持つクエン酸に対して高い応答を示した。ただし、有効な濃度範囲は  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  以下が適当で、それより高濃度の測定には適していない検量線を与えた。この感度向上の原因は、多点でイオン結合する為に膜の架橋が起こって構造変化に与える影響が大きいことと、次の実験で明らかにするように、多価カルボン酸になるほど膜中への取り込み量が増えることの2つが原因として考えられる。

次に芳香族カルボン酸について検討した (Fig. 5-21)。この場合も全て低濃度域で大きな応答を示し多価のカルボン酸ほど高かった。特に3個のカルボキシル基を有するトリメリット酸 (1,2,4-benzenetricarboxylic acid) および2個有するフタル酸では  $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  のオーダーでの定量が可能であり (Fig. 5-22), トリメリット酸の場合  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$  ( $S/N=4.2$ ) の検出限界を得た。多価の芳香族カルボン酸の高い応答の原因は、疎水的な芳香環がクラッド内に浸入することで、水の排除に伴うより大きな構造変化が屈折率の変化を引き起こしているものと思われる。さらに、芳香族カルボン酸の場合で Fig. 5-23 に例示したように、クラッド膜内への吸着量の差が顕著であり、例えば、3種類の芳香族カルボン酸の平衡時の吸着量は安息香酸、フタル酸、トリメリット酸の順にキトサン/PVA膜1グラム当たり0.16, 0.43, 0.90 mmolの値を得た。これは、膜内のキトサンのグルコピラノースユニット当たりに換算すると、それぞれ6.5, 17.8, 37.3%を占めていることになり、かなり多量の有機酸の吸着が起こっていた。このように、多価になるほど多量に取り込まれていることから、多価の酸に対する応答の大きさにはクラッド膜への濃縮効果が大きく働いていることが明らかになった。

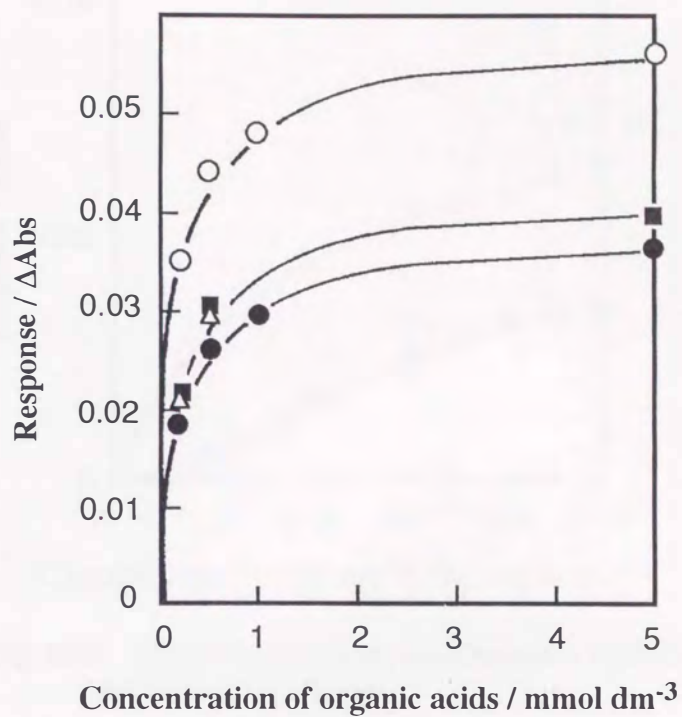


Fig. 5-20 Responses to aqueous citric acid (○), tartaric acid (■), oxalic acid (△) and fumaric acid (●).

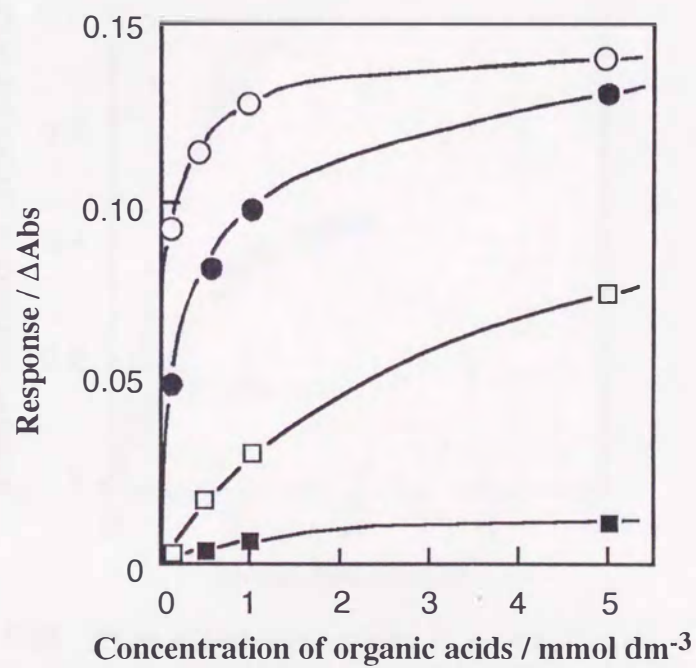


Fig. 5-21 Responses to aqueous trimellitic acid (○), phthalic acid (●), benzoic acid (□) and glycolic acid (■).



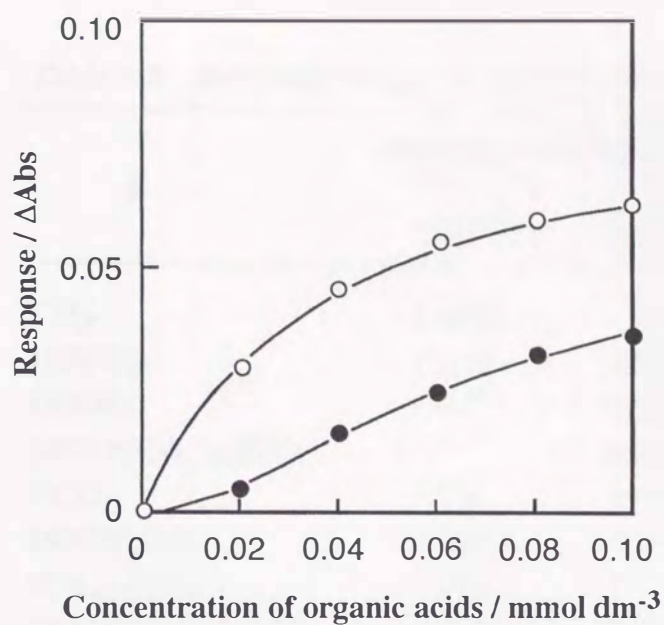


Fig. 5-22 Responses to aqueous trimellitic acid (○) and phthalic acid (●).

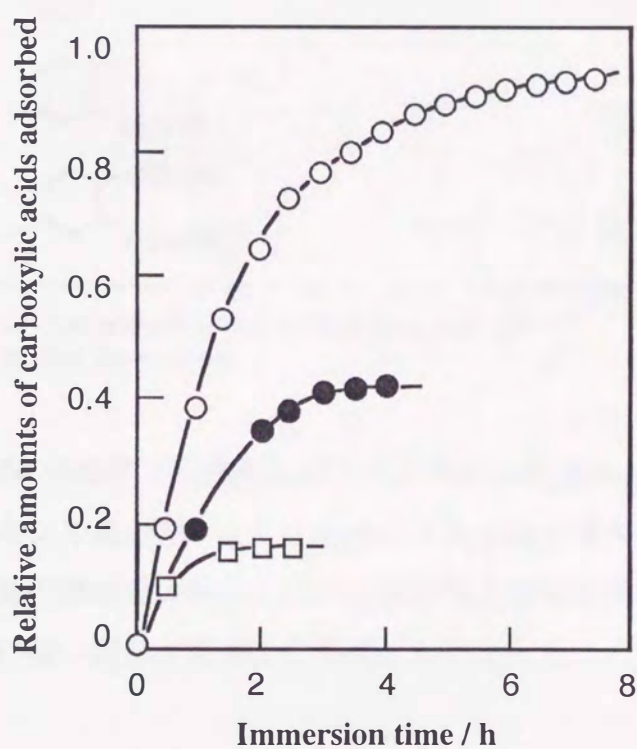



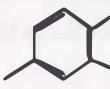


Fig. 5-23 Plots of immersion time vs. adsorption of aromatic carboxylic acid on the BPR-modified chitosan/ PVA membrane. The membrane was immersed in an aqueous solution of  $1.0 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> trimellitic acid (○), phthalic acid (●) and benzoic acid (□).

Table 5-2 Responses to organic acids (RCOOH)

R	Response / $\Delta$ Absorbance	
	$1 \times 10^{-2}$ <sup>a</sup>	$1 \times 10^{-4}$ <sup>a</sup>
CH <sub>3</sub> -	0.0062	— <sup>b</sup>
HOCH <sub>2</sub> -	0.017	0.0047
HOOC-	— <sup>b</sup>	0.030
(HOOCCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (OH)C-	— <sup>b</sup>	0.045
HCO-	0.031	— <sup>b</sup>
HOCH <sub>2</sub> CO-	0.036	— <sup>b</sup>
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCO-	0.042	— <sup>b</sup>
HOOCCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-	0.114	— <sup>b</sup>
 -CH <sub>2</sub> CO-	0.137	— <sup>b</sup>
	— <sup>b</sup>	0.019
 COOH	— <sup>b</sup>	0.083
 COOH COOH	— <sup>b</sup>	0.116

a. Concentrations of substrates in mol dm<sup>-3</sup>.  
b. Not determined.

Table 5-2に代表的な有機酸に対する応答の比較をまとめた。以上のことから、カルボキシル基の数、アルキル基の大きさおよびベンゼン環の有無に代表される置換基の疎水性の強さ、および水素結合能を有する置換基の有無が有機酸の応答量に深い関係があることが明らかになった。

### 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

テフロン保護膜を有しないセンサは無機酸にも応答を示した。例えば、Fig. 5-24に示したように $1.0 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup>の塩酸に対して5 v/v%の酢酸と同程度の応答があった。しかし、テフロンコーティングを行ったプローブではFig.



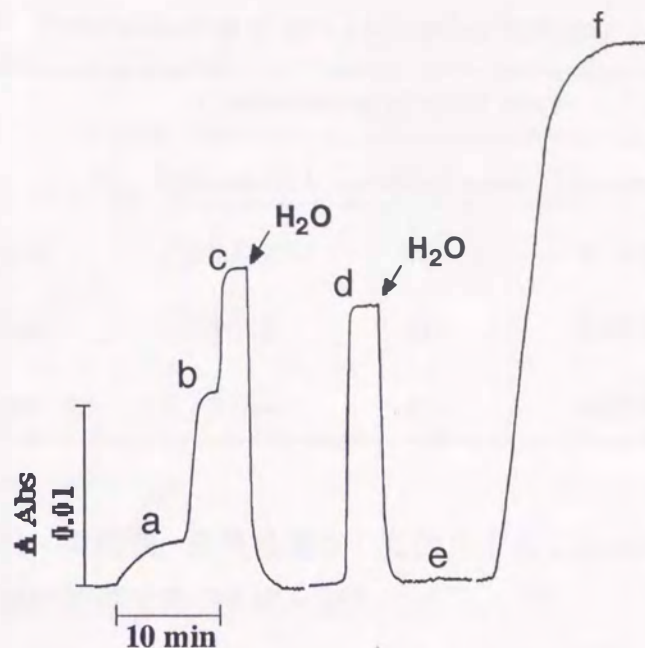


Fig. 5-24 Responses to (a)  $1.0 \times 10^{-4}$ , (b)  $1.0 \times 10^{-3}$  and (c)  $1.0 \times 10^{-2}$  mol dm $^{-3}$  HCl and (d) 5 v/v% CH $_3$ COOH with the probe without Teflon membrane, and those to (e)  $1.0 \times 10^{-3}$  mol dm $^{-3}$  HCl and (f) 5 v/v% CH $_3$ COOH with a Teflon-coated probe. In cases of the responses to HCl without the Teflon membrane, sample solutions were successively admitted into the cell. The arrows indicate the admittance of water.

5-24 eに見られるように、 $1 \times 10^{-3}$  mol dm $^{-3}$  の塩酸に全く応答しなかったが 5 v/v%の酢酸には応答した。酢酸に対する応答量がテフロン膜がない場合 (Fig. 5-24 d) に比べて大きくなっているが、これはセルへの取り付け位置およびロットの違いによるものと思われる。Fig. 5-24 eの塩酸が応答を示さなかったことから、テフロン膜は明らかに塩酸の透過を阻んでいることを示している。また、テフロン膜は第4章で述べたように不揮発性の糖やアミノ酸に対しても応答を阻止する役目を果たすことが明らかになっている。

テフロンコーティングを行った BPR吸着膜をプローブとするセンサを、市販食酢の分析に用いた。結果をTable 5-3に示す。穀物酢、リンゴ酢、米酢ともに滴定値より若干大きい値を示した。食酢には通常揮発性のアルデヒド、エステルなどが微量含まれており、おそらくこれらがプラスの誤差を与えているものと思われる。現時点ではこの誤差を与える物質の特定は出来なかったが、本

**Table 5-3 Determination of acid contents of vinegars**

Vinegar	Concentration of acid / w/v%		
	Proposed method	Certified value	Titrimetric method
Grain vinegar	5.2±0.2	4.2	4.21±0.02
Apple vinegar	5.5±0.1	5.0	5.08±0.02
Rice vinegar	5.7±0.4	4.5	4.54±0.02

センサの高い応答性, 再現性, 耐久性をさらに改良することにより, 有機酸のリアルタイムな定量に使用できるものと思われる.

### 5.3 総括

クラッド膜をグルタルアルデヒドによって弱く架橋し, さらにBPR色素を吸着処理することにより, キトサン/PVA膜をクラッドとする内部全反射型の光ファイバセンサの有機酸への選択性を向上させることが出来た. ただし, この色素吸着の効果は, クラッド中の色素の吸収スペクトルの変化が応答に反映しているのではなく, 主として有機酸によるクラッド膜の屈折率の変化に起因していることを明らかにした. 応答は有機酸の構造に依存し, 脂肪族カルボン酸では置換基の疎水性が高くなるほど強くなった. クラッド膜の糖構造と水素結合の形成可能な置換基, 例えばヒドロキシル基やカルボニル基を有する酸も高い応答を示した. また, 多価のカルボン酸は1価のものに比べて約1000倍高い感度を示した. フェニル基を有するカルボン酸にはさらに高い感度を示し,  $10\mu\text{mol dm}^{-3}$ オーダーでの定量が可能であった. テフロン膜がない場合, 塩酸など無機酸にも応答したが, テフロン保護膜でクラッドを被覆することによって揮発性の有機酸への選択性が向上した. 実際の食酢中の有機酸定量に応用して若干高いが表示値と近い値を得ることが出来た.



## 参考文献

- 1) T. Hano, M. Matsumoto, T. Ohtake, K. Sasaki, F. Hori, Y. Kawano :  
*J. Chem. Eng. Jpn.*, **23**, 734 (1990).
- 2) A. S. Kertes, C. J. King : *Biotech. Bioeng.*, **28**, 269 (1986).
- 3) R. Wennersten : *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **33B**, 85 (1983).
- 4) M. Planta, F. Lazaro, R. Puchades, A. Maquieira : *Analyst*, **118**, 1193 (1993).
- 5) B. F. Kenney : *J. Chromatogr.*, **546**, 423 (1991).
- 6) J. N. Alexander IV, C. J. Quinn : *J. Chromatogr.*, **647**, 95 (1993).
- 7) Y. Hu, Y. Zhang, G. S. Wilson : *Anal. Chim. Acta*, **281**, 503 (1993).
- 8) D. Picque, D. Lefier, R. Grappin, G. Corrieu : *Anal. Chim. Acta*, **279**, 67  
(1993).
- 9) H. Zeng, K. Wang, X. Yang, R. Yu : *Anal. Chim. Acta*, **287**, 267 (1994).
- 10) 日本化学会編：“化学便覧基礎編”改訂3版, p. II-118 (1984) (丸善).