九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

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^{1,2)}.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^{3,4,5}).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⁶⁾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^{7,8})やトリクロロエチレン⁹⁾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¹⁰⁾やナイルレッドの蛍光変化¹¹⁾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^{12,13)}やハロゲン化銀のコアを有する赤外線検出型のセンサ^{14,15,16)}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^{17,18,19)}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²⁰⁾や日本酒中²¹⁾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^{22,23,24)}.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²⁵⁾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²⁶⁾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 らも,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 に思われる.

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、次式のフレネルの反射法則によっ て得られる反射係数 ρ を二乗した反射率 Rに従う.

$\rho_{\rm s} = -$	$n_1\cos\theta i - \sqrt{n_2^2 - n_1^2\sin\theta i}$		1)		1)
	$n_1 \cos \theta i + \sqrt{1 + 1}}} } } } } } } } } } } } } } } } }$	$n_2^2 - n_1^2 \sin \theta i$)		

$$\rho_{\rm p} = \frac{-n_2^2 \cos\theta i + n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin\theta i}}{n_2^2 \cos\theta i + n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin\theta i}} \qquad \cdots 2)$$

ここで、 θ_1 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 θ_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 θ_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 θ_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幡 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、伝幡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、さらには伝幡光量に 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℃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℃12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0.25mol dm-3 酢酸バッ ファー(PH6.0) 13 ml中で60℃,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,2v/v%酢酸水溶液で数回洗浄後0.37mol 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1v/v%の酢酸水溶液20ml(クラッド原液A)に浸漬後引き上げ,30℃ 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1mol 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℃12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20mm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0.41cm³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±0.1℃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13×22mm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1mol dm⁻³ NaOH に3時間浸漬・水洗後,
 0.16mol dm⁻³GA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







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, SiO₂ cladding; H, SiO₂ core; I, chitosan/PVA cladding

から,アタゴのアッベ屈折計1-Tを用いてテストピース(nD=1.6199)と1-ブロ モナフタレン中間液とともに25.0±0.1℃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30µmであった.

同様にして調製した膜を約 0.2 x 0.2 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

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0.1µm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1µm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 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 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(1μm)に対して屈折率測定用 に別途作製した膜は約30μm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 mol dm⁻³ aliphatic alcohols.



Fig. 4-4 Relationship between the response and dielectric constant of organic solvent. Each sample solution contains 0.5 mol dm⁻³ of organic solvent appended beside the circle.







Shrinking index



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 θ_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幡する光は, 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 (θ_c = \sin^{-1} n_2/n_1 = 82.96°)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°より大きくなり, そ れまで全反射していた光の一部分(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幡光量 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 n₂'が変化しても臨界角は82.96°より小さいので、伝幡光量は影響 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.









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²⁷⁾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 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 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⁻³ 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±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±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 あった.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 ehanol concentration introduced into the cell.



Fig. 4-11 Reproducibility and durability of the sensor. Fifty times measurments 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 resetted 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(n₂=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,架橋度が高くになるに従って(●, O)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(O)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 た場合では、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 (O).





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1592cm⁻¹(N-H変角振動)と 1124cm⁻¹(C-N伸縮振動)の吸収が低下し,新たに1665cm⁻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1665cm⁻¹の吸収が相対的に減少し,メチレン基由 来の2909cm⁻¹,脂肪族アルデヒド由来の1725cm⁻¹および,1100cm⁻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(O)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 n₂=1.449に近いか,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

81



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.









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Table4-1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

Alcoholic beverage	Concentration of ethanol / v/v %					
	Certified value	Specific gravity method	Sensor 1 ^a	Sensor 2 ^b		
Shochu A	20	19.9	19.5±0.1	20.9±0.6		
В	25	25.3	25.5 ± 0.4	27.1 ± 0.6		
С	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	— c	14.2 ± 0.2	28.6 ± 3.3		
Red wine	14	— c	12.7 ± 0.3	C		
Whiskey	43	43.1	42.7 ± 0.3	77.4 ± 2.1		
Beer	5	4.4	5.1 ± 0.6	C		

Table 4-1 Determination of ethanol in alcoholic beverages

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²⁸⁾,これらが応

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	

Table 4-2Amounts of non-volatile coexistents in
alcoholic beverages / ppm28)

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²⁹⁾ことを付記する.

85



Fig. 4-17 Interferences from glucose and organic acids in the response of a sensor without Teflon coating. Each solution contains 30 g dm⁻³ of glucose (▲), 0.4 g dm⁻³ of glutamic acid (■), 0.7 g dm⁻³ of lactic acid (●) and none of the additive (O).



Fig. 4-18 Response of the Teflon-coated Sensor. Each solution contains 30 g dm⁻³ of glucose (▲), 0.4 g dm⁻³ of glutamic acid (■), 0.7 g dm⁻³ of lactic acid (●) and none of the additive (O).

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).
- 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).
- 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).
- 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 れて伝幡する,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^{1,2,3)}.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⁴⁾ やキャピラリー電気泳動法⁵⁾ 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⁶⁾ 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⁷⁾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⁸⁾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⁹⁾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⁷⁾,また光ファイバ蛍光センサ⁹⁾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 ブロモピロガロールスルホフタレイン(ブロモ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、1x10⁻⁴ 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 µm)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℃30分架橋した後、1x10⁻⁴ mol dm⁻³の色素水溶液50 cm³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. 屈折率はアッベ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1.0x10⁻⁴ 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 mol dm⁻³の塩酸/塩化カリウム緩衝液を、pH4.0は0.1 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 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0.2cm³ 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℃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 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℃30分間架橋処理した.得られた 膜の厚さは約10μmであった.この膜を1.0 x 10⁻⁴ mol dm⁻³の色素溶液5cm³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1.0x10⁻⁴ mol dm⁻³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ためと思われる.

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. 5-5 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, 1x10⁻⁴ mol dm⁻³ 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に全体的に応答 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1.0x10⁻⁴ mol dm⁻³の水溶液である. BPRはpKa₂=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. 5-7 Response reproducibility and durability of sensor cladding to 5 v/v% AcOH.



Fig. 5-8 UV/VIS absoprtion spectra of 1.0x10⁻⁴ mol dm⁻³ of aqueous (a) BPR, (b) PV, (c) HPT, (d) NT and (e) TR.





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n₂=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個のスルフォ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 るのであろう.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 ルフォン酸基と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個のスルフォ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,スルフォ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 (O), 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 1x10⁻⁴ mol dm⁻³ BPR (O), PV (●), NT (□), HPT (△) 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0.47umol 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 umol) 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℃、30分 間ということを考えると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0.32umol (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 1x10⁻⁴ mol dm⁻³ BPR(O), 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個のスルフォン酸基による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_∞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¹⁰⁾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 5-1Vapor pressure of aliphatic acids calculated
from Antoine's equation

R-COOH	H-	CH ₃ -	CH ₃ CH ₂ -	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -
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 (○) and the vapor pressure of aliphatic acids (●) *vs.* the carbon number.



Concentration of organic acids / mol dm⁻³









Fig. 5-19 Responses to aqueous oxalacetic acid (△), glyoxylic acid (▲), glycolic acid (O) 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1mmoldm⁻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 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10µmol 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 (O), tartaric acid (\blacksquare), oxalic acid (\triangle) and fumaric acid (\bigcirc).



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



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





	Response / Absorbance		
R	a 1x10 ⁻²	1x10 ⁻⁴ ^a	
СН3-	0.0062	b	
HOCH ₂ -	0.017	0.0047	
HOOC-	b	0.030	
(HOOCCH ₂) ₂ (OH)C-	b	0.045	
HCO-	0.031	b	
HOCH ₂ CO-	0.036	b	
(CH ₃) ₂ CHCO-	0.042	b	
HOOCCH ₂ CH ₂ CO-	0.114	b	
СН2СО-	0.137	b	
\bigcirc	b	0.019	
СССООН	b	0.083	
СООН	b	0.116	

 Table 5-2
 Responses to organic acids (RCOOH)

a. Concentrations of substrates in mol dm⁻³.

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1.0x10⁻² mol dm⁻³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) 1.0x10⁻⁴, (b) 1.0x10⁻³ and (c) 1.0x10⁻² mol dm⁻³ HCl and (d) 5 v/v% CH₃COOH with the probe without Teflon membrane, and those to (e) 1.0x10⁻³ mol dm⁻³ HCl and (f) 5 v/v% CH₃COOH 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、1x10⁻³ 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. 5-24d)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

Vincer	Concentration of acid / w/v%				
vinegar	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		

Table 5-3 Determination of acid contents of vinegars

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、 10µmol 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

- 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).
- 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).