研究

光ファイバー pH 化学センサー用キトサン膜

Chitosan Membranes for Optical pH Chemical Sensors

利根川雅実 (正会員), 北原恵一 (正会員), 増田尊子 (非会員),
西村之宏 (非会員), 山下順三 (正会員), 高井信治 (正会員) *

Masami Tonegawa, Keiichi Kitahara, Takako Masuda,
Yukihiro Nishimura, Junzo Yamashita, Nobuharu Takai*

Abstract

A three-layer membrane for optical pH chemical sensors has been developed consisting of layers of polyester support, chitosan-indicator and polyvinyl alcohol-titanium dioxide for reflection. The chitosan membrane was more stable and easier for immobilizing of benzopurpurine 4B or fluorescein isothiocyanate than a cellulose membrane on which polyvinyl alcohol with titanium dioxide and calcium carbonate was coated and heated at 140°C in nitrogen atmosphere followed by dissolving of calcium carbonate to form a porous water-resistant membrane for reflection of light. The sensor membrane shows a pH-induced color change than makes it capable of measuring pH in the 3-7 range.

Keyword

optical sensor, chitosan membrane, pH sensor

1. はじめに

光ファイバー化学センサーは、電極型のセンサーに較べて、(1) 小型に出来ること、(2) 電氣的磁氣的ノイズの影響を受けないこと、(3) 測定中での感電の危険がないことなどの利点から、医学、環境、生物工学の分野への応用が注目されている。¹⁾

光ファイバー化学センサーでは、光ファイバ

ー先端に化学物質認識能を持ち、それを光の変化に変える機能性膜を保持させるが、応答速度を速くするためには、機能性膜は薄くする必要がある。また、機能性膜からの光の変化を反射光として検出するための反射膜も必要である。このため、センサー膜は光透過性の支持膜、機能性膜、反射膜の三層構造にすることが望ましい。²⁾この際、水溶液中の可溶性物質の検出を行う場合には、三層膜が水溶液中で剥離しないこと、機能性膜、反射膜への水溶性物質の浸透が充分速いこと、機能性膜への光応答化学物質の固定化が特に問題となってきた。³⁾

本報告では、これらの問題点を解決するために、ポリエステル製支持膜、キトサン製機能性膜、ポリビニルアルコール-二酸化チタン製反射膜からなる新しい三層構造のセンサー膜を調製し、pH 指示薬を固定化して、pH 測定へ

1996 年 11 月 27 日受付

1996 年 12 月 25 日受理

東京医科大学化学教室

東京都新宿区新宿 6-1-1 (〒160)

* 東京電機大学理工学部

埼玉県比企郡鳩山町石坂 (〒353-3)

Department of Chemistry, Tokyo Medical College
6-1-1, Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160

* Faculty of Science and Engineering, Tokyo Denki
University

Hatoyama-cho, Hiki-gun, Saitama 350-3

の応用を検討した。

2. 実験方法

2.1 試薬、原料など

キトサン (90M SH21-N 加ト吉バイオ製), ポリビニルアルコール (重合度約2,000 和光純薬製) (以下PVAと略す) ポリエチレンテレフタレートシート (ゼロックス製) (以下PETと略す), 二酸化チタン (アナターゼ型 関東化学製), 炭酸カルシウム (沈降製, 岩井化学製) ポリエチレングリコールモノデシルエーテル (重合度25, 東京化成製) (以下PEGMDEと略す) シアノアクリレート瞬間接着剤 (スリーボンド製 1731 A3K016), その他 benzopurprine 4B, fluorescein isothiocyanate (以下FITCと略す) などの試薬は市販品をそのまま用いた。緩衝液はイオン強度 $\mu = 0.1$ のものを文献⁴⁾により調製し, pHメーター (東亜電波製 HM-7B) により補正して用いた。

2.2 キトサン三層構造膜の調製

2.2.1 機能性膜の調製

キトサン 4.0g と 10%酢酸水溶液 200ml を 200ml 共栓付き三角フラスコ中で5日間, マグネティックスターラーを用いて攪拌し, 均一な溶液とした。このキトサン溶液 10ml をポリスチレン製ディスポーザブルシャーレ (内径9 cm OPTILUX Petri Dish FALCON 1001 日本ベクトン製) に注入し, 溶媒を自然蒸発させて薄膜状のキトサンを得た。これを 1N KOH 水溶液中で 30 分中和処理し, ガラス板上で自然乾燥してキトサン膜を得た。(膜厚約 40 μ m)。

次に, benzopurprine 4B 0.50g, 炭酸カリウム 0.10g, 硫酸ナトリウム 0.10g, を含む水溶液 200ml に, 上記キトサン膜を入れ, 90℃, 1時間ゆっくりかきまぜた後, 純水で充分洗浄し, benzopurprine 4B を吸着固定化した機能性膜を得た。

また, fluorescein isothiocyanate 0.1g をアセトン 50ml に溶解した後, 純水 100ml を加え, これに, 上記キトサン膜を入れ, 2時間ゆっくりかきまぜた後, 純水で充分洗浄し, fluorescein isothiocyanate を化学結合固定化した機能性膜を得た。この膜の赤外吸収スペクトルの測定 (日本分光製 IR-700) により, チオカルバミル基の生成を確認した。(Fig.1)

Fig.1 Chemical structure of FITC-chitosan conjugate and benzopurprine 4B.

2.2.2 機能性膜の三層化

PVA 10g を純水 100ml に 90℃で溶解した後, 二酸化チタン 4.0g, 炭酸カルシウム 2.0g, 分散剤 PEGMDE 0.1g, エタノール 5ml を加えて懸濁液を調製した。ガラス板上に前記機能性膜を置き, これに, ガラスリング (内径 46mm) を乗せ, 白色の懸濁液 2ml を注加し, 乾燥した後, 窒素雰囲気下 140℃で 20 分間加熱処理して, 水不溶性の反射膜を積層する事ができた。

次に, 積層した機能性膜の裏面に PET を瞬間接着剤を用いて接着した後, 炭酸カルシウムを溶出して多孔質の反射膜にするために, 0.5N 塩酸中で処理し, 二酸化炭素の発生が終わったことを確認してから, 純水で十分洗浄し, 三層構造のセンサー膜を得た。(Fig.2)

Fig.2 A cross section of three-layered chitosan membrane fixed on a teflon-holder.

2.3 光ファイバーを用いた反射および蛍光スペクトルの測定

光源として Xe ランプ (150W, USHIO XENON SHORT ARC LAMP UXL-DO) を用い, 光ファイバー (トーレ製プラスチックファイバー, TORAY PGU-FB500 2321AC01 3430, 直径 $500\ \mu\text{m}$) は 30 本づつを束ねて送光用および反射光受光用として用い, その先端部にテフロン製ホルダーを付け, Fig.2 に示すように, センサー膜を直径 15mm の円盤状に切り抜いて装着した。分光光度計 (日立製 U-3200) の光源部は, 反射光受光用光ファイバーが装着できるように改良し, 緩衝溶液中で測定したデータは RS-232C 端子を用いて, コンピューター処理した。(Fig.3)

蛍光スペクトルを測定する場合には, 蛍光分光光度計 (日立製 650-10S) を用い, そのセル部分を改良して, 送光用および蛍光受光用の光ファイバー (トーレ製プラスチックファイバー, TORAY PGU-FB500 2321AC01 3430, 直径 $500\ \mu\text{m}$) をそれぞれ 35 本づつを束ねて装着出来るようにし, その先端部にテフロン製ホルダーを付け, Fig.2 に示すように, センサー

Fig.3 Fiber optic pH sensor system for reflection spectra.

膜を装着した。緩衝溶液中で測定したデータは RS-232C 端子を用いて, コンピューター処理した。(Fig.4)

Fig.4 Fiber optic pH sensor system for fluorescence reflection spectra.

3. 結果および考察

3.1 キトサン三層構造膜の調製

キトサンはグルコースのアミノ誘導体であるグルコサミンのポリマーであるので, 親水性であり, 分子中にアミノ基をもつため, 光感応性分子を固定化するのに好都合と考えられる。その製膜条件を検討した結果, キトサンを希酸水溶液に溶解してポリスチレン製シャーレにキャストし, 溶媒を蒸発させた後, 希水酸化カリウム水溶液で中和処理することにより, 平面性の良い膜厚約 $40\ \mu\text{m}$ の薄膜が得られた。

このキトサン膜に水溶液中で fluorescein isothiocyanate, benzopurprine 4B などを固定化し, pH 応答性機能性膜とした。キトサン

膜は、従来用いられてきたセルロース膜に較べて、固定化が容易であった。これは、キトサン分子中のアミノ基によるものと考えられる。

次に反射膜を積層するために、この機能性膜を乾燥後ガラス板上におき、ガラスリングを乗せてから、二酸化チタンを分散させたポリビニルアルコール水溶液をキャストし、得られた二層膜を、窒素気流中 140℃で 20 分間加熱処理し、反射膜を水不溶性とすることが出来た。次に機能性膜のもう一方の側にポリエチレンテレフタレート製シート支持膜を瞬間接着剤を用いて接着し、三層構造のセンサー膜を得た。このようにして得られた三層膜は、水溶液中で反射膜、機能性膜の膜中に水が浸透しても、充分長時間膜の剥離が認められず、安定した性能を示した。

3.2 反射および蛍光スペクトルの測定による pH の測定

センサー膜は直径 15mm の円盤状に切り抜き、反射スペクトル測定装置のテフロンホルダーに装着し、種々の pH 緩衝液中、400~750nm の範囲で反射スペクトルを測定した。機能性キトサン膜になにも固定化しなかったセンサー膜では、Fig.5 に示すように、pH3.04~7.04 の範囲で反射スペクトルに変化は見られず、この

Fig.5 Reflection spectra of chitosan membrane in buffer solutions of constant ionic strength $\mu=0.1$ at various pH values.

Fig.6 Reflection spectra of benzopurpurine 4B immobilized on chitosan membrane at various pH values (ionic strength $\mu=0.1$).

Fig.7 Plot of reflections light intensity of benzopurpurine 4B immobilized on chitosan membrane at 650nm as a function of pH values.

三層構造センサー膜の安定性が示された。

次に benzopurpurine 4B を固定化したセンサー膜の反射スペクトルを Fig.6 に示す。450~750nm の反射スペクトルは pH3~7 の範囲で変化し、650nm での反射強度は pH の増加に伴い増加する (Fig.7)。

次に fluorescein isothiocyanate を固定化したセンサー膜の反射スペクトルを Fig.8 に示す。450~700nm の反射スペクトルは pH3~7 の範囲で変化し、586nm での反射強度は pH の増加

Fig. 8 Reflection spectra of FITC immobilized on chitosan membrane at various pH values (ionic strength $\mu=0.1$).

Fig. 9 Plot of reflection light intensity of FITC immobilized on chitosan membrane at 650nm as a function of pH values.

Fig. 10 Fluorescence spectra of FITC immobilized on chitosan membrane excited at 410nm for various pH values (ionic strength $\mu=0.1$).

に伴い増加する (Fig.9)。また、励起光波長 410nm に対し、蛍光スペクトルを測定した結果を Fig.10 に示す。蛍光スペクトルは、555nm で、pH4~8 の範囲でほぼ直線的に増加する傾向が見られる (Fig.11)。

応答時間については、pH2.07 から pH6.74 に変化させたときの 558nm での反射強度の時間変化を Fig.12 に示す。約 20 分で安定した値に到達することが判る。また、pH6.74 で、650nm での反射強度を 4 日間測定した結果を Fig.13 に示す。反射強度は一定の値を示し、色素の固定化と三層膜の水溶液中での安定性が良いことが示された。

Fig. 11 Plot of fluorescence light intensity of FITC immobilized on chitosan membrane at 555nm excited at 410nm as a function of pH values.

Fig. 12 Response of reflection light intensity for FITC immobilized on chitosan membrane at 558nm towards changes in pH. Initial pH of 2.07 was changed to 6.74 at $t=0$.

Fig.13 Stability of FITC immobilized on chitosan membrane. Reflectance spectra was measured at 650nm for pH 6.74 at a intervals of 24 hours.

4. まとめ

従来用いられてきたセルロース膜の代わりにキトサン膜を用いることにより、benzopurprine 4B の染着固定化が著しく改善され、また、fluorescein isothiocyanate もキトサンのアミノ基と速やかに反応し、固定化が容易になった。ポリビニルアルコール-二酸化チタン製反射膜は、窒素中での加熱処理により、また、ポリエステル製支持膜は瞬間接着剤の使用により、水溶液中でも剥離しない接着をすることに成功し、丈夫な三層膜を得ることが出来た。このような安定なセンサー膜を用いることにより、pH3~8 の範囲で光ファイバー化学セ

ンサーによる pH の測定が容易に行えるようになり、小型化も容易であるので、今後医療、環境などへの応用が期待される。

謝辞

今回の研究で用いたキトサンを提供していただいた加ト吉バイオサイエンス研究室の次田隆志氏に感謝します。

文献

- 1) 鈴木孝治, 久本秀明: オプトード, ぶんせき, (2): 112-120, 1995.
- 2) 利根川雅実, 藤井誠, 増田尊子, 西村之宏, 北原恵一, 山下雄也, 山下順三, 高井信治: 光ファイバーセンサー用機能性膜の調製, 医科器械学 64 (Suppl.): 50-51, 1994.
- 3) M.J.P.Leiner, O.S.Wolfbeis: Fiber Optic Chemical Sensors in Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors, Vol.I. (Ed. O.S. Wolfbeis) CRC Press Inc., Boca Baton, Florida, Chap.8, 359-384, 1991.
- 4) 日本化学会編: 実験化学講座 24 生物化学 II, 丸善, 222, 1958.