

報 文

キトサンを塗布した双型水晶発振子を用いる銅(II) の定量

包 山 虎*, 野村 俊明®*

Determination of copper(II) in solution using a twinned piezoelectric quartz crystal coated with chitosan

Shanhu BAO and Toshiaki NOMURA*

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Shinshu University, 3-1-1, Asahi, Matsumoto-shi, Nagano 390-8621

(Received 25 December 2001, Accepted 4 March 2002)

A twinned piezoelectric quartz crystal (PQC) was constructed with two of one electrode-separated PQCs, one of which oscillates separately. One of them was coated with a functional polymer film which could adsorb an analyte and the other with a polymer film having the same frequency behavior against the liquid properties, except for the adsorption of an analyte. Thus, the different frequency behaviors between the one electrode-separated PQCs result mainly from the adsorption of the analyte. On the other hand, the frequency behavior caused by the chitosan coating could be controlled with a coating of cellulose acetate on the other PQC. By controlling the experimental conditions, the twinned PQC selectively adsorbed copper(II), and the frequency change was proportional to the concentration. The adsorption of copper(II) onto chitosan, however, increased with the frequency. It was supposed that the adsorbed water on the chitosan with the hydrogen bond was removed by complexing with copper(II), and then the frequency was increased because of decreasing mass on the chitosan.

Keywords : copper(II) ; piezoelectric quartz crystal(PQC) ; chitosan.

1 緒 言

厚みすべり振動をする水晶発振子は、1959年 Sauerbrey により微量てんびん¹⁾として提案され、ナノグラムレベルの超高感度及び取り扱いの簡便さや安価のために、水晶発振子に様々な機能性膜を塗布して大気中の微量成分や揮発性有機物を定量するために使われてきた²⁾。更に、野村ら³⁾及び Konash ら⁴⁾により、水晶発振子が溶液中でも発振することが報告され、より広い分野での応用が可能となり、化学分析に限らず生化学、環境、食品や臨床にも利用されるようになっている。

溶液中のセンサーとして、水晶振動子の両面に電極が蒸着されている水晶発振子のほかに、片面電極分離型⁵⁾⁶⁾及び完全電極分離型⁷⁾⁸⁾などの水晶発振子が開発され、利用

されてきた。しかし、溶液中の振動数は物質の付着により変化するだけでなく、液性^{9)~11)}や液温、表面の粗さ¹²⁾、界面における分子のすべり¹³⁾、親水性や疎水性¹⁴⁾によって変化する。したがって、水晶発振子を溶液中のセンサーとして取り扱う際、溶液の温度、電気伝導度、密度、粘度、誘電率等の影響を取り除く必要があり、双型水晶発振子¹⁵⁾が開発された。双型水晶発振子は、外側に金電極を蒸着している2枚の水晶振動子を平行に設置し、間に白金板を挿入して、二つのオシレーターを用いて別々に発振させるものである。なお、双型水晶発振子のそれぞれの水晶振動子の振動数特性は、溶液の電気伝導度、誘電率、密度及び粘度に対して、従来の片面電極分離型水晶発振子と同様であることが報告されている¹⁵⁾。

本研究では定量分析用として、2枚ある水晶振動子の一方に機能性膜としてキトサンを塗布し、他方に被検体を付着しないほかの高分子を塗布して、液性や液温の影響を除

* 信州大学理学部化学科: 390-8621 長野県松本市旭 3-1-1

去する方法、及びキトサンを塗布した水晶振動子の溶液中の振動数挙動を調べるとともに、金属イオンのキトサン膜との錯体形成反応を利用して、選択的に銅(II)を付着させることを試みた。

2 実験

2・1 装置

用いた水晶振動子(九州電通製)は直径8mm, 9MHzのATカットで、水晶振動子の片方のみに直径5mmの金電極を蒸着したものである。双型水晶発振子はこの水晶振動子二つを金電極を外向きにして平行に設置し、間に白金板電極を挿入したものである¹⁵⁾。

それぞれの水晶振動子はトランジスターオシレーターに接続し、直流定電圧電源を用いて6.0Vの電圧を印加した。振動数は周波数計(岩崎通信、SC7204)で読み取るとともに、パーソナルコンピュータ(NEC、PC9801VM)に接続し、振動数を記録した。試料溶液などは送液ポンプ(井内盛栄堂、MP-3)を用いて、双型水晶発振子を装備したフローセル内に一定の流量で流れるようにした。なお、液温は恒温槽で一定にした。

2・2 試薬

高分子を水晶振動子に塗布するための貯蔵溶液は、キトサン1000(和光純薬製、一級)を5wt%酢酸水溶液に、酢酸セルロース、エチルセルロース(和光純薬製)とポリメタクリル酸メチル(Aldrich Chemical)はアセトンに、ポリスチレン(General Science Corporation)はベンゼンに、濃度が2mg/mlになるようにそれぞれ溶かして冷蔵庫に保存した。標準溶液を調製するために用いた試薬は、すべて特級試薬(和光純薬製)であり、金属イオンの貯蔵溶液の濃度は0.01Mとし使用の都度希釈した。緩衝溶液はアンモニウム塩を使用した。

キトサン膜の塗布には、2M水酸化ナトリウム水溶液で水晶振動子を30分間脱脂し、脱イオン水で洗浄して乾燥した後、適当な濃度のキトサン溶液4μlを塗布面積が裏面の金電極の大きさと同じになるように滴下する。そしてガラス管に差し込み、40℃の恒温器で30分間乾燥する。次にメタノールと2M水酸化ナトリウム水溶液の1:1混合溶液を注いで、2時間放置した後、脱イオン水で十分洗浄してフローセルに装着する。キトサンを塗布した後、30分以上乾燥すると硬くなり過ぎて、発振しなくなる場合がある。また、キトサンの塗布量の増加につれて水中における基本振動数が減少したが、その減少した振動数変化量は、Sauerbreyの式¹⁾によって予想した理論振動数減少量よりも大きくなかった(Fig. 1)。これはキトサン膜表面と水分子との間で水素結合が形成し、多量の水が付着して水晶振動子の質量が増加したために、より大きい振動数変

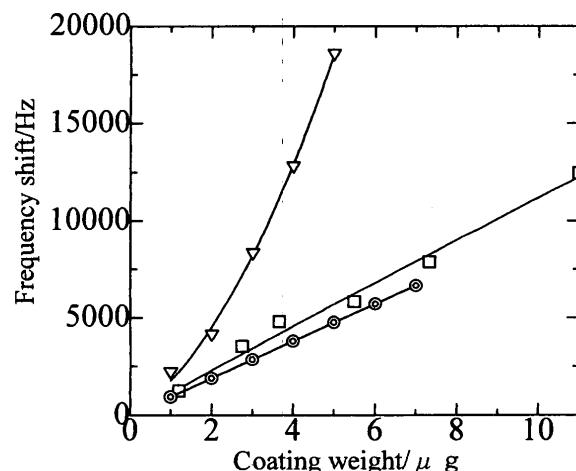


Fig. 1 Relationship between the frequency shift and the coating weight

△: chitosan; □: polystyrene; ○: calculated values from Sauerbrey equation. Flow rate: 4.5 ml/min, Temperature: 22°C

化量が得られたものと考えられる。一方、ポリスチレンは計算値とおおむね一致している。なお、キトサン膜は酸性溶液中では不安定であるが、塩基性溶液中では非常に安定であり、キトサンを塗布した水晶振動子を半年使用しても、膜の損失による振動数の減少は見られなかった。

ほかの高分子膜は、水晶振動子をアセトンで洗浄して、40°Cで乾燥した後、それぞれの保存溶液4μlを水晶振動子の真中に、ちょうど裏面の金電極の大きさと同じになるように滴下して乾燥させた。

2・3 実験操作

脱イオン水を流した後、空試験溶液として60mMアンモニウム塩緩衝溶液を振動数が一定になるまで流し、次に金属イオン試料溶液を3分間流した。再び空試験溶液に戻して振動数が一定になるまで流し、金属イオンの付着による振動数変化量を求める。キトサン膜上へ付着した金属イオンは、10mMアンモニウム塩緩衝溶液で調製した1mM EDTA溶液を10分間流して溶離した。

3 結果及び考察

3・1 双型水晶発振子の溶液中での振動数挙動

双型水晶発振子を装備しているフローセルへ、流量4.5ml/minで脱イオン水を流して振動数が一定になった後、各種濃度のスクロース水溶液、塩化カリウム水溶液に切り替え、振動数変化量を調べた。40%濃度までのスクロース水溶液中で安定に発振し、二つの水晶振動子(A及びB)とも振動数変化量(ΔF , Hz)は溶液の粘度(η_L)及び密度(ρ_L)に対して、式 $\Delta F = a[(\eta_L \rho_L)^{1/2} - 1.0]$ (a : 比例定数)に従い¹¹⁾よく一致した。塩化カリウム水溶液中でも

電気伝導度が 0.5 mS/cm までは、二つの水晶振動子とも電気伝導度に比例して振動数変化量が増加し、振動数挙動はよく一致した。1 mS/cm 以上になると、二つの水晶振動子の間には約 500 Hz の差が生じたが、その差は一定であり、両者とも電気伝導度が増加しても振動数変化量は一定となった。一般に電極と水晶振動子との距離が大きくなるにつれて、振動数変化量が大きくなるので、二つの水晶振動子と白金板電極との間の距離のわずかな違いが、振動数挙動に変化を与えたものと考えられる。実際の実験において、空試験溶液と試料溶液は、緩衝溶液あるいは弱電解質溶液を加えることによって、電気伝導度差を 0.5 mS/cm 以下に制御し一定にすることができるので、電気伝導度の影響は無視できる。

溶液の温度が 29°C から 32°C に変化したとき、双型水晶発振子を構成する二つの水晶振動子の振動数は、それぞれ 98 Hz 及び 108 Hz 増加し、液温が 32°C から 31°C に変化したとき、それぞれ 89 Hz 及び 91 Hz 減少した。液温が変化したとき、水晶振動子の基本振動数は大きく影響を受けるが、二つの水晶振動子の振動数挙動がほぼ同じであるので、その振動数差はほぼ一定であり、測定中では温度からの影響も無視できる。

キトサンを塗布した水晶振動子 A 及び、膜塗布していない水晶振動子 B より構成される双型水晶発振子に、塩化ナトリウム、塩化カリウム、及び塩化アンモニウム水溶液を流したときの振動数挙動を Fig. 2 に示す。ほかの型の水晶発振子と同様に溶液の電気伝導度に対して、膜を塗布していない水晶振動子 B の振動数挙動は化学種に関係がないが⁷⁾、キトサンを塗布した水晶振動子 A は膜のない水晶振動子 B と比べれば、いずれの化学種においても振動数変化量が大きく、そして化学種によって振動数変化量が異なる。これはキトサン膜にアミノ基があるため、酸性や中性溶液中ではキトサン塩を生成して、電気伝導度の影響を受けやすいためと思われる。

したがって、キトサン塗布により生じるこの差を相殺するため、他方の水晶振動子 B には、酢酸セルロース、エチルセルロース、ポリメタクリル酸メチルなどの高分子を塗布して、溶液の温度、電気伝導度、粘度及び密度に対する振動数挙動を考察した。検討した膜の中で、酢酸セルロース膜のみがキトサン膜と振動数挙動がよく一致した。なお、双型水晶発振子において、それぞれの水晶振動子と中央に設置した白金板電極との間隔が異なると、たとえ両方の水晶振動子に同種の膜を塗布しても、振動数特性に差異が生じることが分かり、間隔にも注意をすることが重要である。

3・2 キトサン膜上への物質の付着による振動数挙動

60 mM アンモニウム塩緩衝溶液 (pH 9.5) を用いて調

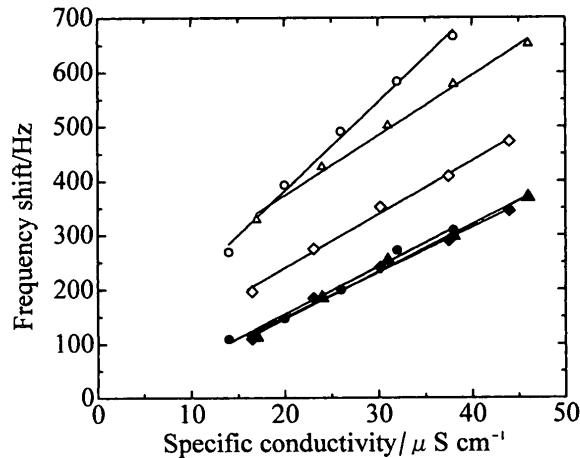


Fig. 2 Frequency shifts of PQC-A coated with chitosan (○, △, ◇) and PQC-B uncoated (●, ▲, ◆) in sodium chloride (○, ●), potassium chloride (△, ▲) and ammonium chloride (◇, ◆) solutions

Other conditions as in Fig. 1.

製した、銅(II)、ニッケル(II)、コバルト(II)、カドミウム(II)、亜鉛(II) 及び銀(I) の 6 種類の金属イオンそれぞれ 6 μM を含む溶液を、双型水晶発振子に 3 分間流した際の、キトサン膜上への付着による振動数変化の状態を Fig. 3 に示す。これらの金属イオンの中で、銅(II) はキトサン膜上へ強く付着し、アンモニウム塩緩衝溶液を流しても振動数が減少せず、付着した銅(II) は膜表面から溶離していないと思われる。ニッケル(II)、コバルト(II)、カドミウム(II) 及び亜鉛(II) もキトサン膜上に付着するが、付着による振動数変化量は銅(II) より少なく、金属イオン溶液が流れている間に振動数が一定になり、アンモニウム塩緩衝溶液を流すと振動数が徐々に減少し、キトサン膜からこれらの陽イオンが徐々に溶離したものと思われる。なお、この条件下では、銀(I) は付着しなかった。一方、酢酸セルロースを塗布した水晶振動子 B へのこれらの金属イオンの付着による振動数変化は見られなかった。

一般に溶液中に浸された水晶発振子（基本振動数 F , MHz）は、大気中と同様に、面積 A (cm²) 上に物質が Δm (g) 付着すると、式 $\Delta F = -2.3 \times 10^6 F^2 (\Delta m/A)$ に従つて¹⁾、質量増加により振動数が減少（変化量 ΔF , Hz）する。しかし、Fig. 3 から明らかなように、金属イオンがキトサン膜表面上に付着すると振動数が増加する。これは塗布したキトサン膜にキトサンの質量の約 2 倍量の水が付着している (Fig. 1) が、金属イオンの結合により多量の水が放出され、結果的に水晶振動子上の質量が減少したために振動数が増加したものと思われる。

リン酸塩水溶液を用いて調製した硫酸ドデシルナトリウム (SDS) 水溶液を、キトサンを塗布した水晶振動子上に流すと、振動数が増加してから減少した (Fig. 4)。また、

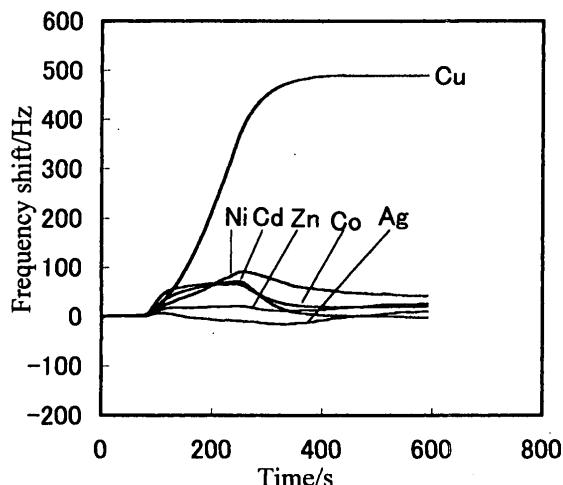


Fig. 3 Frequency behavior of PQC-A coated with chitosan (3 µg) in 60 mM ammonium salt buffer solution (pH 9.5) containing 6 µM metal ions for 3 mins. Other conditions as in Fig. 1.

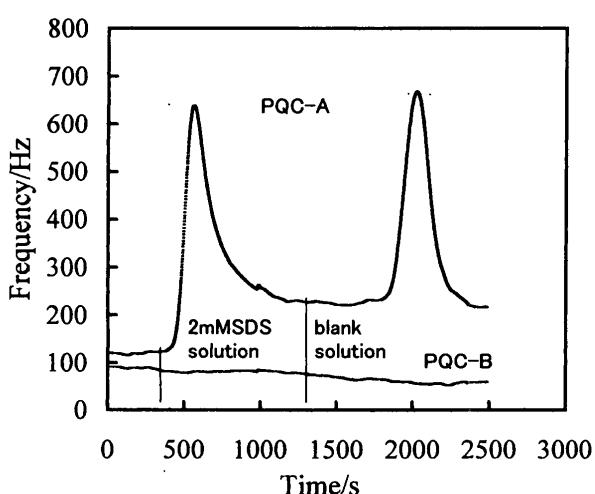


Fig. 4 Adsorption behavior of anionic surfactant (SDS) onto the PQC-A coated with chitosan (3 µg) in 15 mM phosphate buffer solution (pH 8.0)

Other conditions as in Fig. 1.

リン酸塩緩衝溶液を流すと、付着したときと逆に進むと考えられる振動数変化を示した。pH 8.0 ではキトサン膜は正に帯電しており、SDS が最初に親水性部分で付着してキトサン膜表面に水素結合で付着している水を追い出し、振動数が増加したと考えられる。キトサン膜表面上に親水性部分で付着できなくなると、次に疎水性部分で SDS が付着して水晶振動子上の質量が増加するために、水晶振動子の振動数が減少するものと考えられる。リン酸塩緩衝溶液を用いて溶離すると、逆の現象が起こるために鏡像関係の振動数変化が起こったものと思われる。一方、SDS 水溶液をポリスチレン膜上へ流したところ、まず液性による

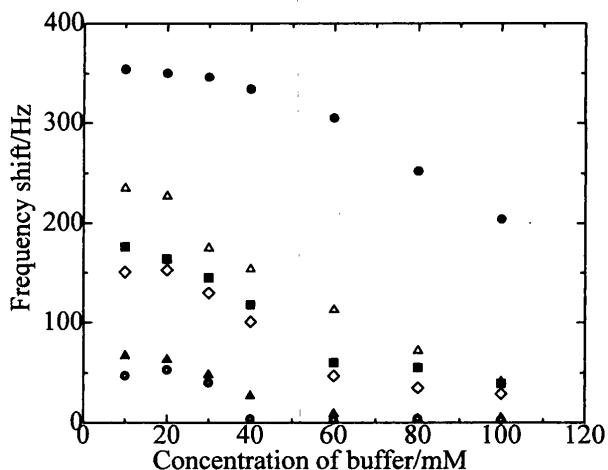


Fig. 5 Frequency shift of PQC coated with chitosan (2 µg) in various concentration of ammonium salt buffer solution (pH 9.5) containing 6 µM metal ions (●: copper, △: nickel, ■: cobalt, ◆: cadmium, ▲: lead, ○: silver)

Other conditions as in Fig. 1.

振動数の減少が現れ、次に SDS の付着によると思われる振動数の減少が現れた。この減少量は SDS の濃度の増加とともに増加した。この場合ポリスチレン膜上には水が付着していない (Fig. 1) ので、SDS の付着による質量の増加のみとなり、振動数が減少したものと思われる。このように、塗布した機能性膜によっては、物質の付着することによって振動数が増加することがあるが、詳細については後日報告する予定である。

3.3 銅(II) の選択的付着に対する最適条件

3.3.1 緩衝溶液の濃度及び pH の影響 アンモニウム塩緩衝溶液の濃度を変化させて、種々の金属イオンの付着挙動を調べた (Fig. 5)。アンモニウム塩緩衝溶液の濃度の増加につれて、銅(II) 以外の金属イオンの付着による振動数変化量が大幅に減少した。これはアンモニウム塩の濃度の増加につれて、金属アンミン錯体とキトサン膜上のアミノ基との配位子置換反応が難しくなって付着しなくなるためと考えられる。したがって、緩衝溶液の濃度を制御することによって、銅(II) をより選択的にキトサン膜上へ付着させ、ほかの金属イオンからの妨害が避けられることが分かり、本研究では 60 mM のアンモニウム塩緩衝溶液を選んだ。アンモニウム塩緩衝溶液の pH を変化して、銅(II) の付着挙動を調べた結果、pH が大きくなるにつれて付着による振動数変化量が減少した (Fig. 6)。これは上に述べたように、銅(II) の付着が銅(II) のアンミン錯体とキトサン錯体との競争反応によるためと考えられる。したがって、1:1 の 60 mM のアンモニウム塩緩衝溶液 (pH 9.5) を使用した。

3・3・2 温度及び流量の影響 測定中の恒温槽の温度を10°Cから30°Cまで変化させて、銅(II)のキトサン膜上への付着に対する温度の影響を調べたところ、温度が1°C上昇するにつれて付着による振動数変化量がほぼ12Hz増加した。この原因は、キトサン膜上への錯体形成反応は温度が高くなるほど速くなるためと思われる。絶対温度の逆数に対して振動数変化量の対数をプロットすると直線を与え、この直線の傾きからArrhenius式¹⁶⁾により、錯体形成反応の活性化エネルギー ΔE_a を求めるとき32.0 kJ mol⁻¹となった。流量を2 ml/minから8 ml/minまで変化して測定したところ、流量が速いほど付着による振動数変化量が大きくなかった。これはキトサンと銅(II)との結合が安定するために、銅(II)溶液の量が増加するにつれて、付着量が増加したためと思われる。本実験では4.5 ml/minを用いることにした。

3・3・3 キトサン塗布量と銅(II)の付着による振動数変化量との関係 キトサン塗布量の増加につれて、6.0 μM銅(II)の付着による振動数増化量は大きくなかった。銅(II)のキトサン膜上への付着挙動は単純な錯形成反応と

考えられ、キトサンの塗布量が大きくなるほど、単位面積中に付着する水の量が増加するため(Fig. 1)、銅(II)の結合により放出される水の量が増加して振動数変化量が増加したものと考えられる。

3・3・4 共存イオンの影響 ニッケル(II)、コバルト(II)、カドミウム(II)、亜鉛(II)及び銀(I)は妨害しないが、アルカリ性で沈殿を生成する鉄(II)、鉄(III)、マンガン(II)、鉛(II)及びアルミニウム(III)は妨害する。そこでトリエタノールアミン、グリシン、クエン酸二水素カリウムなどのマスキング剤を使って、妨害イオンの影響を調べた。これらの1 mMのマスキング剤を含む溶液中では、6 μM銅(II)イオンの付着による振動数変化量は、それぞれ104, 22, 221 Hz、マスキング剤を入れていない場合(390 Hz)と比べれば、それぞれ73.4, 94.4, 43.3%減少した。したがって、本実験でクエン酸二水素カリウムをマスキング剤として選んで妨害イオンの影響を調べた。各種イオンの付着による振動数変化量をTable 1に与えた。以上よりマスキング剤としてクエン酸塩を用いることにより感度は減少するが、妨害を少なくすることができる事が分かり、銅(II)にこれらの金属イオンを共存させた場合、銅(II)の付着による振動数変化を誤差5%以内で求めることができた。

3・3・5 銅(II)の濃度と振動数変化量との関係 双型水晶発振子の水晶振動子A上にはキトサン(キトサンの塗布による振動数変化量は10295 Hz)を、水晶振動子Bには酢酸セルロース(酢酸セルロースの塗布による振動数変化量は5420 Hz)を塗布して、銅(II)溶液の濃度(C , μM)に対する付着による振動数変化量(ΔF , Hz)との関係を調べた。1~10 μMの濃度範囲の銅(II)溶液を3分間流した際の検量線は $\Delta F = 55.8C + 15.2$ で、相関係数は0.9990であり、良好な直線関係が得られた。6 μM銅(II)溶液による7回の繰り返し測定の相対標準偏差は1.1%、検出限界は0.05 μMであった。また、0.1~1 μMの銅(II)標準溶液(濃度 C_1 , μM)を10分間流すことによって得られた検量線(振動数変化量 ΔF_1 , Hz)は $\Delta F_1 = 152.5C_1 + 20.7$ で、相関係数は0.993であり、より低濃度

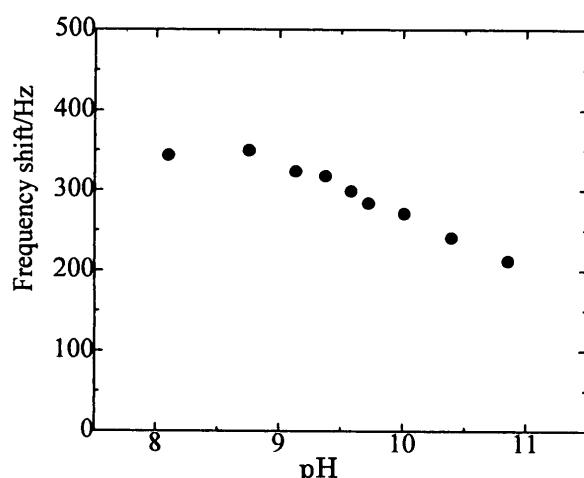


Fig. 6 Frequency shift of PQC coated with chitosan(2 μg) in various pH of 60 mM ammonium salt buffer solution containing 6 μM Cu(II)

Other conditions as in Fig.1.

Table 1 Frequency shifts on adsorption of various metal ions on twinned PQC coated by chitosan in 60 mM ammonium salt buffer solution

Metal ions/μM	Without masking agent/Hz	1 mM Sodium citrate/Hz
6 μM Cu(II)	390	221
60 μM Fe(III)	※	4
60 μM Pb(II)	※	10
600 μM Mn(II)	※	5
600 μM Al(III)	※	7
800 μM Ca(II)	30	4
800 μM Mg(II)	25	3

※ precipitate

の銅(II)が測定できることが分かった。

4 結 語

溶液中では水晶発振子の振動数は液温や液性によって変化するので、これらのセンサーを取り扱う際には、これらの因子の影響を考慮すべきである。このため双型水晶発振子が開発され、溶液中の振動数挙動を調べてきた。溶液の電気伝導度、密度、粘度及び液温に対する二つの水晶振動子の振動数挙動を一致させるために、一番重要なことは二つの水晶振動子と白金板電極との距離を等しくすることや、それぞれのオシレーターの印加電圧にある。しかし、片方の水晶振動子のみに膜を塗布すると、二つの水晶振動子の表面状態に差（膜の親水性や疎水性差、水素結合の生じる、又は膜電荷の違いなど）が生じ、振動数挙動も異なるので他方の水晶振動子には目的物質を付着しない、同じ特性を持つほかの高分子を塗布することによって液性の影響が相殺できる。

キトサン膜はアンモニウム塩緩衝溶液中では、銅(II)に対して非常に大きな振動数変化量が得られ、濃度と振動数変化量との間で直線関係を示した。したがって、検量線法により銅(II)の選択的定量が可能であり、試料溶液を長時間流すことによってより低濃度の銅(II)の定量が期待される。

（1999年5月、第60回及び2001年6月、第62回分析化学討論会、及び2000年9月、第31回中部化学関係学協会支部連合秋季大会にて一部発表）

文 献

- 1) G. Sauerbrey: *Z. Phys.*, **155**, 206 (1959).
- 2) W. H. King, Jr.: *Anal. Chem.*, **36**, 1753 (1964).
- 3) 野村俊明、嶺村昭子: 日本化学会誌, **1980**, 1621.
- 4) P. L. Konash, G. J. Bastiaans: *Anal. Chem.*, **52**, 1929 (1980).
- 5) 野村俊明、山田 徹: 日本特許公開公報 (A) 平371038 (1991).
- 6) 野村俊明、田中文人: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **39**, 773 (1991).
- 7) T. Nomura, F. Tanaka, T. Yamada, H. Itoh: *Anal. Chim. Acta*, **243**, 273 (1991).
- 8) T. Nomura, T. Yamada: U.S. Patent, 5235238 (1993).
- 9) 野村俊明、奥原 守、村田可奈子、服部 治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **30**, 417 (1981).
- 10) T. Nomura, M. Okuhara: *Anal. Chim. Acta*, **142**, 281 (1982).
- 11) K. K. Kanazawa, J. G. Gordon: *Anal. Chem.*, **57**, 1770 (1985).
- 12) R. Schumacher, G. Borges, K. K. Kanazawa: *Surf. Sci.*, **163**, L621 (1985).
- 13) F. Ferrante, A. L. Kipling, M. Thomoson: *J. Appl. Phys.*, **76**, 3448 (1994).
- 14) W. C. Duncan-Hewitt, M. Thompson: *Anal. Chem.*, **64**, 94 (1992).
- 15) 野村俊明、稻野辺重理、藤田 宏: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 583 (1998).
- 16) 藤代亮一訳: “物理化学(上)”, p. 369 (1974), (東京化学同人); W. J. Moore: “Physical Chemistry”, (1972), (Prentice-Hall, Inc., U.S.A.).

要 旨

本研究では別々に発振する二つの片面電極分離型水晶発振子を用いて双型水晶発振子を構成し、片方には機能性膜としてキトサンを塗布して、溶液中の振動数挙動を考察するとともに銅(II)選択性センサーを開発した。キトサン塗布により生じる振動数差は、もう片方には被検体を付着しない、溶液中で同じ振動数挙動を持つ酢酸セルロースを塗布して制御した。双型水晶発振子上に膜を塗布したときの振動数挙動を詳細に検討した結果、液性や温度の影響を除去できることが分かった。被検体の付着によって二つの水晶発振子の間に振動数差が生じる。キトサンを塗布した双型水晶発振子の銅(II)の選択的付着に対する最適条件を検討し、振動数変化量は銅(II)の濃度に比例した。一般に水晶振動子上へ物質が付着すると質量増加につれて水晶発振子の振動数が減少するはずであるが、キトサン膜上への銅(II)の付着においては振動数が増加した。キトサン膜上に錯形成によって水素結合により付着している水が追い出されたため振動数が増加したと考えられる。