

水+エタノール+クエン酸カリウム系における
アミノ酸の分配係数の測定

菅原, 健太 / SUGAWARA, Kenta

(発行年 / Year)

2008-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2008-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2007 年度 修士論文

水 + エタノール + クエン酸三カリウム三成分系
液液平衡とアミノ酸の分配係数の測定

LIQUID-LIQUID EQUILIBRIA OF THE TERNARY SYSTEM
WATER+ETHANOL+TRIPOTASSIUM CITRATE AND MEASUREMENT
OF DISTRIBUTION COEFFICIENTS OF SOME AMINO ACIDS

指導教授 片山 寛武 教授

法政大学大学院工学研究科

物質化学専攻修士課程

06R2112

スガワラ ケンタ
菅原 健太

Abstract

Liquid-Liquid Equilibria (LLE) for the ternary system water + ethanol + tripotassium citrate ($C_6H_5O_7K_3$) were measured at temperatures of (288.15, 298.15 and 308.15) K. The bimodal curves at each temperature were given using a nonlinear equation. The tie lines were correlated by the Othmer-Tobias and Bancroft equations. The results of the phase equilibria were predicted using the nonlinear and Othmer-Tobias equations, nonlinear and Bancroft equations, or Othmer-Tobias and Bancroft equations. The predictions showed close agreement with experimental values with 0.22, 0.26, and 0.20 % as the average deviations of mass fractions respectively. LLE of quaternary systems water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$ including five amino acids were measured at temperature of 298.15K. Distribution coefficients of the amino acids were determined. It was found that leucine and tryptophan were mainly distributed to the top phase, but glycine, glutamine, and arginine to the bottom phase.

Key Words : *Liquid-Liquid Equilibria , Distribution Coefficient, Amino acid, Potassium citrate, Ethanol*

目次

| | |
|----------------------------------|----|
| 1. 緒言 | 1 |
| 2. 理論 | 2 |
| 2.1 液液平衡 | |
| 2.2 分配 | |
| 2.3 バイオ関連物質の性質と分離精製 | |
| 3. 実験方法 | 5 |
| 3.1 試薬 | |
| 3.2 実験装置 | |
| 3.3 水+エタノール+クエン酸三カリウム三成分系液液平衡の測定 | |
| 3.3.1 試料の作成 | |
| 3.3.2 試料の採取 | |
| 3.3.3 分析方法 | |
| 3.4 アミノ酸の分配係数の測定 | |
| 3.4.1 試料の作成 | |
| 3.4.2 試料の採取 | |
| 3.4.3 分析方法 | |
| 4. 結果及び考察 | 11 |
| 4.1 水+エタノール+クエン酸三カリウム三成分系液液平衡の測定 | |
| 4.1.1 相関式 | |
| 4.1.2 測定値及び相関値の検討 | |
| 4.1.3 タイラインの温度変化 | |
| 4.1.4 他の塩による系との比較 | |
| 4.2 アミノ酸の分配係数の測定 | |
| 4.2.1 測定値 | |
| 4.2.2 分配係数の検討 | |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 5. 結言 | 37 |
| 5.1 水 + エタノール + クエン酸三カリウム三成分系液液平衡の測定 | |
| 5.2 アミノ酸の分配係数の測定 | |

| | |
|------|----|
| 参考文献 | 39 |
|------|----|

謝辞

1. 緒言^{1),2)}

水 + 脂肪族アルコール系に特定の塩を加えた三成分系は多くの工業的利用可能性を有している。代表的な応用例として、塩の精製及びバイオ関連物質等の抽出分離、精製等があげられる。塩の精製への応用とは、塩が溶けている水溶液に有機溶媒を加えると、通常、溶解度が減少するという性質を利用して、主に従来の晶析法では難しい水に対する溶解度の大きな塩に対して、新たな精製法としての利用が期待される。バイオ関連物質等の抽出分離、精製への応用とは、特に水 + 低級アルコール系において、上相にもある程度の水を含むことから、非高分子の水性二相系ともいえ、限定的ではあるが、すでに工業的にも利用されている高分子の水性二相系(水 + ポリエチレングリコール + デキストラン等)と同様に穏和な系であり、不安定で失活しやすいバイオ関連物質等の抽出分離、精製における系としての利用が期待される。このような工業的利用のためには、系の液液平衡(LLE)データが必要不可欠である。

水 + 脂肪族アルコール系の一つである、水 + エタノール系に特定の塩を加えた三成分系に関しても、これまでに多くの LLE の測定が行われ、報告されている^{2),3),4)}。これまでに報告された水 + エタノール系の二相分離を引き起こす塩の特徴として、水に対する溶解度が大きいことが上げられる。今回、我々は、水に対する溶解度の非常に大きいクエン酸三カリウム($C_6H_5O_7K_3$)においても、水 + エタノール系の二相分離を引き起こすことを発見した。この水 + エタノール + $C_6H_5O_7K_3$ 系は、両相密度差が大きく、静置のみで容易に二相分離が可能であることに加え、クエン酸三カリウムの人体への無害性、微生物による分解の容易性等により、上記バイオ関連物質等の抽出分離、精製における新規な系として利用できると期待される。

そこで、本研究では水 + エタノール + $C_6H_5O_7K_3$ 三成分系液液平衡の測定を 288.15K、298.15K 及び 308.15K の各温度で行なった。また測定値を一つの非線形方程式、Othmer-Tobias 式及び Bancroft 式を用いて相関し、溶解度曲線及びタイラインを決定した。さらに、バイオ関連物質の分配特性を調べるため、その構成単位であるアミノ酸を上記三成分に加えた四成分系液液平衡の測定を 298.15K において行い、各アミノ酸の分配特性を調べた。

2. 理論^{5),6)}

2.1 液液平衡

液体成分が相互に飽和溶解度に達している平衡状態のことを液液平衡という。液液平衡は、気液平衡が蒸留の基本であり固液平衡が晶析の基本であるのと同じように、液液抽出の基本である。ただし、液液抽出は液体混合物中の目的成分を分離するのに第三成分の溶媒を加えなければならないので、液液抽出に使われる液液平衡関係は少なくとも三成分系である。

成分A,B,Cからなる三成分系の液液平衡関係を模式的に示す(Fig.1)。この図においては、成分AとCからなる二成分系と成分BとCからなる二成分系はそれぞれ均一な液体混合物をつくり、成分AとBからなる二成分系は不均一系混合物すなわち二相を形成する。そして、そのときの相互溶解度はR'とE'ある。ここで、成分AとCからなる組成Sの二成分系混合液に成分Bを添加する。はじめは完全に溶け合っ均一な液相つまり一液相を作っているが、成分Bを加えていくと(図中の直線SB上を変化して)点Qで飽和溶解度に達する。このような操作を繰り返すことによって、曲線R'RQPEE'が描かれる。この曲線のことを三成分系の溶解度曲線という。なお点Pはブレイトポイントと呼んで三成分系の相互溶解の極限を示す点である。また直線ERは対応線(タイライン)といい、互いに平衡にある液相の組成を結ぶ線である。たとえば、点Mで示す組成で三成分系をつくると、二つの液相に分かれて液液平衡状態になり、そのときの各液相の平衡組成がEとRになる。

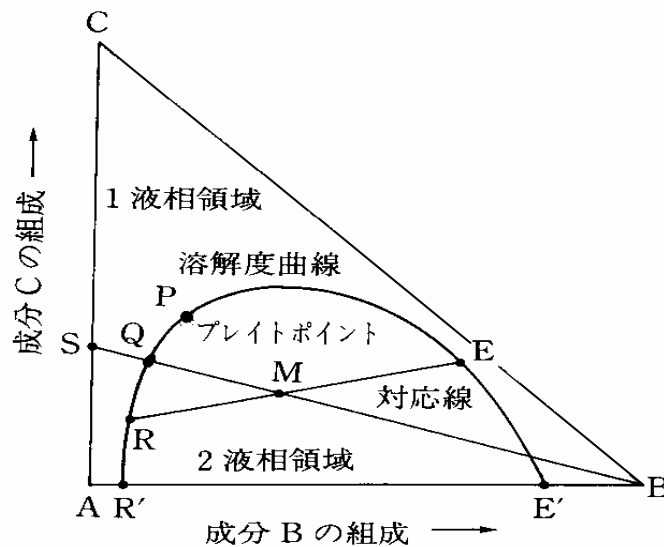


Fig.1 LLE(ternary system)

2.2 分配

分配 (partition) は、互いに接触している二液相内の目的物質の濃度の違いに基づいた分離精製方法である。二相間の分配係数は標準化学ポテンシャルの差により決まる。成分 A, B に着目した場合、相 1 と相 2 におけるそれぞれの成分濃度比を分配係数とよび、 K_A, K_B で表し、次式で定義される。

$$K_A = C_{A1} / C_{A2} \quad (2.1)$$

$$K_B = C_{B1} / C_{B2} \quad (2.2)$$

ここで、 K_A, K_B は成分 A, B の分配係数、 $C_{A1}, C_{A2}, C_{B1}, C_{B2}$ はそれぞれ相 1、相 2 における成分 A, B の濃度を表す。

K_A, K_B は、目的物質及びきょう雑物質と溶媒の間の相互作用、すなわち溶解性の差に強く依存する。 K_A, K_B は、一般的には成分 A, B が単独で存在する場合と共存する場合は異なった値を示すので、注意を要する。 K_A と K_B の比 K_A / K_B を分離係数とよび、 α で表す。 α の値が大きい程、相 1 には A 成分は高濃度に、同時に B 成分は低濃度に分配され、A 成分の精製度が高いことを表す。分配の違いを利用する分離法は相 2 に含まれる目的物質 A を相 1 により抽出する操作であるともいえる。

分配を利用した分離法には用いられる抽出剤に対応して、熱水抽出法 (hot water extraction)、有機溶媒抽出法 (solvent extraction)、水性二相抽出法 (aqueous two-phase extraction)、超臨界流体抽出法 (supercritical fluid extraction) などがある。熱水抽出法は、熱に比較的強い成分を熱水に対する高い溶解性を利用して分離する方法である。工業的には食品分野においてよく利用されている。

有機溶媒抽出法では低分子の抗生物質や脂質など有機溶媒中での変性が起こりにくい物質が対象となる。有機溶媒と水相における目的物質の分配の違いを利用する。

性質の異なる二種類の水溶性高分子を含む水溶液は、適当な条件下ではそれぞれ組成の異なる二相に分離する。二相の組成が異なるために目的物質に対する相互作用 (溶解性) が異なる。水性二相抽出法はこのような二相系での物質の分配を利用した分離法である。二相が形成される条件は、高分子の種類、分子量、濃度、共存する塩、pH、温度などにより異なる。最もよく利用されるのは、デキストラン (Dex) とポリエチレングリコール (PEG) の組み合わせである。この方法は、有機溶媒を使用しないために、不安定で失活しやすい酵素やタンパク質などの分離に使用される。工業的に使用するためには、高価な高分子の回収と再利用できることが前提となる。

超臨界流体は、諸物性が気体と液体の中間の値をとる。温度が一定の条件では、圧力を増加させることにより密度が顕著に増加する。固体または液体と接する超臨界流体中の溶質の濃度は、溶質と超臨界流体間の分子間相互作用が増加する結果、気体中よりも大きくなる。さらに、相互作用の程度は、物質によっても異なる。この性質を利用して、工業的

には天然物からの有効成分の抽出や、コーヒー豆や紅茶からの脱カフェイン、タバコからの脱ニコチンがあげられる。抽出剤である超臨界流体と抽出された物質の分離が容易であるので、食品や医薬品関連物質の分離精製への展開が期待される。

2.3 バイオ関連物質の性質と分離精製

バイオ関連物質は実に多種多様であり、糖類、アミノ酸・脂肪酸、タンパク質・酵素、多糖、核酸、細胞などはすべてバイオ関連物質である。さらに複雑な構造を有する生理活性物質や最近のバイオ医薬品など、例をあげれば枚挙にいとまがない。これらの物質のほとんどすべては、基礎研究の分野でも工業生産においても分離精製の対象になる。バイオ関連物質は低分子化合物からタンパク質・酵素などの高分子物質、さらには細胞にいたるまで、その大きさは多岐にわたる。また、分子量や分子の大きさが異なるだけでなく、化学的・物理的性質も多様である。

分離精製はバイオテクノロジーの分野だけでなく、化学などの分野でも重要でかつ困難な操作である。しかし、バイオ関連物質の分離精製は、石油から製造する化学物質などの一般の化学物質の場合よりもはるかに困難である。

バイオ関連物質は、変性などの構造変化や化学変化を受けやすい。例えば、タンパク質は熱、pH、酵素、せん断応力などの環境因子により、立体構造の変化（変性）やその構成単位であるアミノ酸の化学変化を受ける。分離精製の過程で、このような変化が生じないように分離精製方法や条件の選択を行わなければならない。また、分離精製にかかる時間も極力短くしなければならない。原液中に目的物質と化学的・物理的性質が類似なきような雑タンパク物質が多数含まれる場合もある。このような場合、両者の物理的・化学的性質の違いにはほとんど差異がないので、目的のタンパク質を精製することがいかに困難であるかが、容易に推測される。

食品や医薬品などのバイオ関連物質は人類が摂取するという点から、通常極めて高い純度を必要とする。微生物菌体の培養液中には、パイロジェン（pyrogen）とよばれる発熱悪寒物質が混入していることが多いが、その濃度はきわめて低い。パイロジェンのような超微量有害物質も除去しなければならない点もこの分野の特徴である。バイオ関連物質の分離精製において要求される高い純度を達成するためには、一般的には分離精製のステップ数を多くする必要がある。しかし、ステップ数が多くなるに伴い、純度は高くなるが、回収率は加速的に低下する。高い収率を維持しながら、高い精製度を達成するという相反する条件を満足するために、分離精製方法、分離精製の条件を十分に検討しなければならない。

3. 実験方法

3.1 試薬

本研究において使用した試薬を以下に示す。

抽剤、塩および標準物質

| | | |
|---------------|---------------|------------|
| 蒸留水 | | |
| エタノール | (99.5%以上)試薬特級 | 和光純薬工業株式会社 |
| クエン酸三カリウム一水和物 | (99.0%以上)和光特級 | 和光純薬工業株式会社 |
| 1-プロパノール | (99.0%以上)試薬 | 東京化成工業株式会社 |

アミノ酸

| | | |
|---------|---------------|------------|
| グリシン | (99.0%以上)試薬特級 | 和光純薬工業株式会社 |
| ロイシン | (99.0%以上)試薬特級 | 和光純薬工業株式会社 |
| グルタミン | (99.0%以上)試薬特級 | 和光純薬工業株式会社 |
| トリプトファン | (99.0%以上)試薬特級 | 和光純薬工業株式会社 |
| アルギニン | (98.0%以上)和光特級 | 和光純薬工業株式会社 |

ニンヒドリン法⁷⁾

| | | |
|-----------------------|----------------|------------|
| ニンヒドリン | アミノ酸自動分析用 | 和光純薬工業株式会社 |
| ヒドリンダンチン(無水) | アミノ酸自動分析用 | 和光純薬工業株式会社 |
| メチルセロソルブ(2-メトキシエタノール) | アミノ酸自動分析用 | 和光純薬工業株式会社 |
| 酢酸(精密分析用) | (99.9%以上)精密分析用 | 和光純薬工業株式会社 |
| 酢酸ナトリウム(無水) | (98.5%以上)試薬特級 | 和光純薬工業株式会社 |

3.2 実験装置

試料作成に使用した装置を以下に示す（装置の概略は Fig.2 を参照）。

| | |
|-----------|---|
| 恒温槽用温度調節器 | TAITEC THERMO MINDER SX-10R |
| 恒温槽 | TAITEC ステン断熱水槽 |
| 温度計 | HEWLET・PACKARD 2804A QUARTZ THERMOMETER |
| 冷凍機 | TAITEC COOL-PIPE150LF |

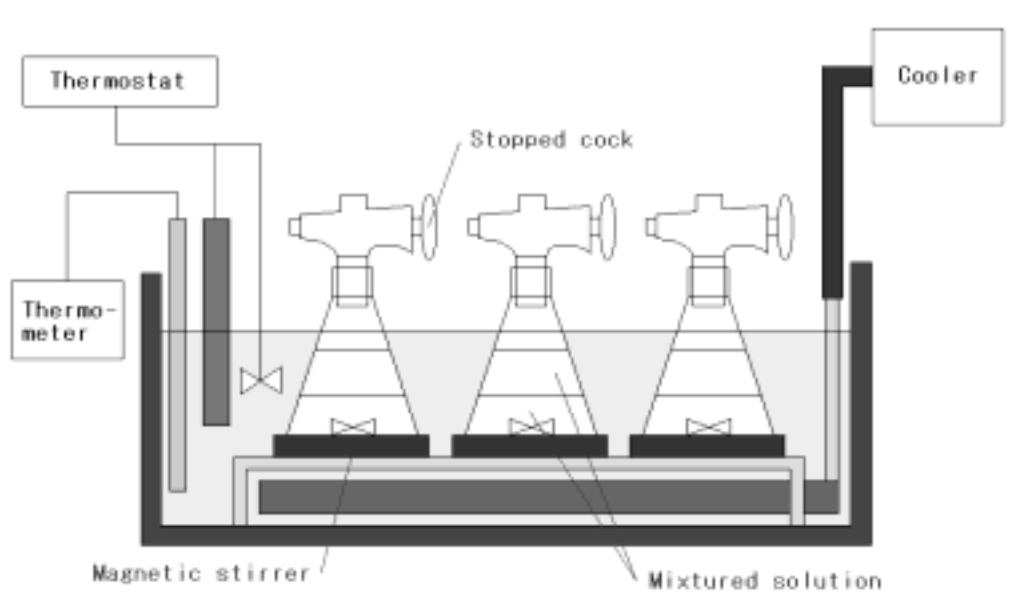


Fig.2 Experimental equipment

分析に使用した機器を以下に示す。

重量法

| | |
|------|--|
| 乾燥機 | ISUZU CONSTANT TEMPERATURE OVEN MODEL 2-2132 |
| 電子天秤 | SHIMADZU AUY220（誤差 $\pm 0.0001\text{g}$ ） |

ガスクロマトグラフィー

| | |
|-------------|--------------------------------|
| ガスクロマトグラフィー | 島津製作所 GC8-A(TCD) |
| クロマトパック | 島津製作所 C-R6A |
| キャリアガス | ヘリウム（株）ジャパンヘリウムセンター，純度 99.99%） |

ニンヒドリン法

| | |
|-------|--|
| 分光光度計 | (株)アペレ PD-303S (測定波長範囲 340nm ~ 1000nm, 精度 ± 2nm) |
| ドライバス | BI Type17600 Dri-Bath (温度範囲 Rt ~ +110 , 温度精度 ± 0.5) |

3.3 水 + エタノール + クエン酸三カリウム三成分系液液平衡の測定

3.3.1 試料の作成

水、エタノール及び $C_6H_5O_7K_3$ 飽和溶液の混合液約 50ml を混合比を変えながらそれぞれ三角フラスコに入れ密栓し、恒温槽中で 4 時間以上攪拌後、12 時間以上静置して試料を作成した。試料は、288.15K、298.15K 及び 308.15K (温度誤差 ± 0.05K) の各温度について、相分離を引き起こさなくなるまで混合比を変化させて作成した。

3.3.2 試料の採取

あらかじめ試料を採取するための 10ml 三角フラスコ及び 40×40 秤量ビンの重量を測定した。

二液相に分離した試料の両相を、組成分析のため注射器で取り出した。まず上相をガスクロマトグラフィー測定用に約 1ml、10ml 三角フラスコにとり、重量法用に約 10ml、40×40 秤量ビンにとった。次に下相をガスクロマトグラフィー測定用に約 1ml、10ml 三角フラスコにとり、重量法用に約 3ml、40×40 秤量ビンにとった。

3.3.3 分析方法

試料中の $C_6H_5O_7K_3$ は重量法で分析を行った。3.3.2 で採取した試料の重さを量り、乾燥機に入れ水及びエタノールを完全に揮発させた後、デシケーター内で室温にし、再びその重さを測定した。乾燥は、温度を 80 で約 20 分、120 で約 70 分、190 で約 70 分と段階的に引き上げて行った。空の秤量ビンの重さ、試料の重さ及び乾燥後の試料の重さから、 $C_6H_5O_7K_3$ の組成を決定した。

試料中のエタノールについてはガスクロマトグラフィーで分析を行った。組成は 1-プロパノールを標準物質にした、内部標準法で同定した。3.3.2 で採取した試料の重さを量った後、約 2ml の標準溶液を加えて再び重さを量り、その後、ガスクロマトグラフィーに約 1 μ l 注入した。標準溶液は約 0.005 ~ 0.008(w/w)に調整した濃度既知の 1-プロパノール水溶液を用いた。得られた AREA 比(エタノール/1-プロパノール)から、あらかじめ作成した検量線により重量比(エタノール/1-プロパノール)を求め、エタノールの組成を決定した。

作成した検量線、使用したカラム及び測定条件を以下に示す。

検量線

重量比(エタノール/1-プロパノール) = $0.9334 \times \text{AREA 比(エタノール/1-プロパノール)}$
 $R^2=0.9999$

カラム

Porapak Q (MESH;80/100、ステンレスカラム、内径;3.0mm、全長;2.0m)

設定条件

CURRENT 100mA

ATTEN 6

INJ/DET 230

COL(INT) 200

ピークの保持時間

water 0.55 minutes

ethanol 1.55 minutes

1-propanol 2.95 minutes

3.4 アミノ酸の分配係数の測定

3.4.1 試料の作成

水、エタノール及び $C_6H_5O_7K_3$ 飽和溶液の混合液約 50ml を混合比を変えながらそれぞれ三角フラスコに入れ、さらにあらかじめ作成した 10mmol/l アミノ酸 1ml を加えた後、密栓し、恒温槽中で 4 時間以上攪拌後、12 時間以上静置して試料を作成した。試料は、298.15K (温度誤差 $\pm 0.05K$) の温度で、相分離を引き起こさなくなるまで混合比を変化させて作成した。アミノ酸はグリシン(Gly)、ロイシン(Leu)、グルタミン(Gln)、トリプトファン(Trp)及びアルギニン(Arg)を用いた。

3.4.2 試料の採取

試料の採取方法は 3.3.2 とほぼ同様である。以下に 3.3.2 との変更点及び追加した操作を示す。

- ・ガスクロマトグラフィー測定用には正確に 1ml、メスピペットを用いて採取した。これは試料の密度を知るためである。

- ・ニンヒドリン法用に、上相及び下相それぞれ正確に 2ml、メスピペットを用いて試験管にとった。

3.4.3 分析方法

試料中の $C_6H_5O_7K_3$ 及びエタノールは 3.3.3 と同様にして分析を行った。

試料中のアミノ酸は、ニンヒドリン法で分析を行った。3.4.2 で採取した試料にあらかじめ作成したニンヒドリン試薬 2ml を加え、約 92 に設定したドライバスに 15 分間入れ、その後 25 分間室温で放置した。その後 50wt% エタノール溶液 4ml を加え、分光光度計を用いて 570nm における吸光度を測定した。得られた吸光度からあらかじめ作成した検量線によりアミノ酸の組成を決定した。

作成した各アミノ酸の検量線を以下に示す。

グリシン

$$\text{吸光度} = 0.0881 \times \text{濃度} [\text{mg/l}] \quad R^2 = 0.9996$$

ロイシン

$$\text{吸光度} = 0.0365 \times \text{濃度} [\text{mg/l}] \quad R^2 = 0.9999$$

グルタミン

$$\text{吸光度} = 0.0287 \times \text{濃度} [\text{mg/l}] \quad R^2 = 0.9999$$

トリプトファン

$$\text{吸光度} = 0.0228 \times \text{濃度} [\text{mg/l}] \quad R^2 = 0.9987$$

アルギニン

$$\text{吸光度} = 0.0275 \times \text{濃度} [\text{mg/l}] \quad R^2 = 0.9996$$

* グリシンの検量線は 50wt%エタノール溶液 5ml を加えて作成したものであるので、分析の際にも 50wt%エタノール溶液 5ml を加えて測定を行った。

* 3.4.2 で採取した試料は必要に応じて希釈を行った。これは吸光度の値を約 0.7 以下におさえるためである。

* ニンヒドリン試薬はあまり安定ではない。冷蔵庫に保管し、一週間ごとにつくり替えたものを使用した。

4. 結果及び考察

4.1 水 + エタノール + クエン酸三カリウム三成分系液液平衡の測定

実験より測定した液液平衡(LLE)のデータを Table1 に示した。 w_1 , w_2 及び w_3 はそれぞれ水、エタノール及び $C_6H_5O_7K_3$ の質量分率を表す。上相はエタノールに富んだ相に、下相は水及び $C_6H_5O_7K_3$ に富んだ相となった。また各温度において、上相及び下相のエタノールの占める割合は上相 0.3774 ~ 0.8100(w/w)、下相 0.0192 ~ 0.1618(w/w)となった。

4.4.1 相関式

今回、測定値の相関に用いた非線形方程式(Nonlinear eq) (1)、Othmer-Tobias 式 (2)及び Bancroft 式 (3) を以下に示す。これらの3式はすべて経験式で、塩を用いた三成分系にも適用することができる。

$$\ln w_2 = a + bw_3^{0.5} + cw_3 + dw_3^2 \quad (1)$$

$$\left(\frac{1-w_2^T}{w_2^T} \right) = k_1 \left(\frac{1-w_3^B}{w_3^B} \right)^n \quad (2)$$

$$\frac{w_1^B}{w_3^B} = k_2 \left(\frac{w_1^T}{w_2^T} \right)^r \quad (3)$$

ここで、添え字 T 及び B はそれぞれ上相(Top phase)、下相(Bottom phase)を表し、 $a, b, c, d, k_1, n, k_2, r$ はパラメーターである。測定値から各式のパラメーターを決定し、(1),(2)及び(3)式のいずれか2式を用いて測定値を相関した。

4.1.2 測定値及び相関値の検討

Fig.3 ~ 5 に 298.15K における測定値と、4.1.1 で紹介した相関式より求めた LLE の相関結果を示した。Fig.3 は(1),(2)式を、Fig.4 は(1),(3)式を、Fig.5 は(2),(3)式を用いて測定値を相関した。Fig.3 ~ 5 より相関した溶解度曲線及びタイラインは測定値とほぼよい一致をしているといえる。Fig.6 ~ 8 及び Fig.9 ~ 11 にそれぞれ 288.15K 及び 308.15K において、298.15K と同様にして相関したものを示した。Fig.6 ~ 8 及び Fig.9 ~ 11 より、288.15K 及び 308.15K においても測定値と相関値はほぼよい一致をしていることが確認できる。

Tables2,3 に決定したパラメーターを、Table4 に測定値と相関値の偏倚を示した。偏倚の計算には相二乗平均偏倚(The root-mean-square deviation)を用いた。以下に偏倚の計算式を示した。

$$dev(i) = \frac{\sqrt{\sum_{n=1}^N \sum_{k=1}^2 (w_{i,k,n,cal} - w_{i,k,n,exp})^2}}{2N} \times 100.0 \quad (4)$$

ここで、 i は成分、 k は相(number of phases)、 n は LLE データ数(1to $N=9-12$)を表す。

Tables2,3 より各式のパラメーターは R^2 (The squared correlation coefficients)の値が 0.9961~0.9998 で決定できたことが分かる。Table4 より、各温度において、(1),(2)式、(1),(3)式及び(2),(3)式を用いて計算した時の偏倚の算術平均値 (average deviation) はそれぞれ 0.22, 0.26 及び 0.20 となった。このことから本系は、(1), (2)及び(3)式のいずれの 2 式を用いても、測定値を精度よく相関できるといえると考えられる。

4.1.3 タイラインの温度変化

各温度における測定値のタイラインを Fig.12 に示した。タイラインの温度による変化は若干ではあるが温度が高くなるにつれて傾きが急になっていることが分かる。これは温度が高くなるにつれて $C_6H_5O_7K_3$ の水に対する溶解度が増加し、水と $C_6H_5O_7K_3$ の結びつきが強くなること、及び水とエタノールの水素結合が温度上昇により若干弱まるためだと考えられる。しかしながら溶解度曲線の温度による変化はほとんど見られなかった。したがって、本系における温度の影響は、タイラインの傾きを若干変化させ、二相領域についてはほとんど変化させないものと考えられる。

4.1.4 他の塩による系との比較

Fig.13 に水 + エタノール系の二相分離を引き起こす他の塩による系と本系の溶解度曲線の比較を示した。比較した塩は Cs_2SO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , K_2CO_3 であり、それぞれ文献^{2),3),4)}から LLE データを引用した。Fig.13 より、 $C_6H_5O_7K_3$ は上相、下相のエタノール濃度差が比較的大きい系であることが分かる。また二相領域の大小関係は $Cs_2SO_4 < C_6H_5O_7K_3 < NaH_2PO_4 < K_2HPO_4 < K_2CO_3$ となった。これは各塩の水に対する溶解度及び結晶の水和数が関係しているものと思われる。すなわち、 K_2CO_3 は例外となったが、溶解度及び結晶の水和数が大きい塩ほど、二相領域が大きくなるものと考えられる。Table5 に各塩の溶解度及び結晶の水和数を示す。

4.2 アミノ酸の分配係数の測定

アミノ酸を加えた四成分系液液平衡測定の結果を Table6 に示した。 w_4 はアミノ酸の質量分率を表す。 K はアミノ酸の分配係数であり次式で定義した。

$$K = \frac{w_4^T}{w_4^B} \quad (5)$$

4.2.1 測定値

Fig.14~18 に、それぞれ、得られた四成分系のデータから作成した 298.15K における Gly, Leu, Gln, Trp 及び Arg の相図である。 Fig.14~18 各アミノ酸は両相に分配されているが、Gly, Gln 及び Arg は下相に、Leu 及び Trp は上相により分配されたことが分かる。これは Ming Chu ら⁸⁾が行った PEG+Na₂SO₄+H₂O の水性二相系でもほぼ同様な結果が得られており、本系がアミノ酸の分配に関して、水性二相系と同様の性質を有しているものと考えられる。

4.2.2 分配係数の検討

Fig.19 に横軸に上相、下相のエタノール濃度差を、縦軸に分配係数の対数をプロットし、各アミノ酸について比較したグラフを示した。 $\ln K$ が正の値であるものは上相に、負の値であるものは下相により多く分配していることを表している。 Fig.19 より、上相、下相のエタノール濃度差が大きくなるほど、各アミノ酸の分配係数は正值のものは大きく、負値のものは小さくなっていることが分かる。また同濃度差における各アミノ酸の分配係数の大小関係は Arg<Gly<Gln<Leu<Trp となっていることが分かる。水に対する各アミノ酸の溶解度の大小関係は、Gly>Arg>Glu>Leu>Trp であることから、分配係数と水に対する溶解度には、負の相関関係があるものと思われる。また、この結果について、各アミノ酸の側鎖の構造に着目して考察すると、以下のことがいえると考えられる。

- Trp は芳香環を有しており、疎水性が非常に大きい。
- Leu は疎水性の炭化水素基を有し、また極性の官能基を持たないため疎水性が大きい。
- Gln は疎水性の炭化水素基と親水性のカルボキシル基(そのアミド)を有する。
- Gly は側鎖を持たず、したがって親水性のアミノ基の影響が強い。
- Arg は極性のある窒素原子を含む官能基を多く有し、親水性が非常に大きい。

このような各アミノ酸の構造の違いにより、分配係数の大小関係は Arg<Gly<Gln<Leu<Trp となったと考えられる。

以上より、本系における各アミノ酸の分配特性は、各アミノ酸の水に対する溶解度及び各アミノ酸の側鎖の構造を調べることにより、ある程度の予測が可能と考えられる。

Table7 に今回使用した各アミノ酸の諸性質を示す。

Table 1. LLE for the System water (1) + ethanol (2) + $C_6H_5O_7K_3$ (3)

| T/K | Top phase | | | Bottom phase | | |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | w ₁ | w ₂ | w ₃ | w ₁ | w ₂ | w ₃ |
| 288.15 | 0.5172 | 0.3774 | 0.1054 | 0.5673 | 0.1618 | 0.2709 |
| | 0.4926 | 0.4403 | 0.0671 | 0.5635 | 0.1239 | 0.3126 |
| | 0.4887 | 0.4457 | 0.0656 | 0.5630 | 0.1224 | 0.3146 |
| | 0.4562 | 0.4988 | 0.0450 | 0.5536 | 0.1016 | 0.3448 |
| | 0.4329 | 0.5328 | 0.0343 | 0.5519 | 0.0869 | 0.3612 |
| | 0.4287 | 0.5377 | 0.0336 | 0.5504 | 0.0853 | 0.3643 |
| | 0.3798 | 0.6019 | 0.0183 | 0.5313 | 0.0660 | 0.4027 |
| | 0.3687 | 0.6169 | 0.0144 | 0.5225 | 0.0600 | 0.4175 |
| | 0.3488 | 0.6410 | 0.0102 | 0.5264 | 0.0383 | 0.4353 |
| | 0.3188 | 0.6736 | 0.0076 | 0.5060 | 0.0396 | 0.4544 |
| | 0.2364 | 0.7617 | 0.0019 | 0.4464 | 0.0284 | 0.5252 |
| | 0.2206 | 0.7780 | 0.0014 | 0.4379 | 0.0192 | 0.5429 |
| 298.15 | 0.5169 | 0.3914 | 0.0917 | 0.5763 | 0.1465 | 0.2772 |
| | 0.4716 | 0.4756 | 0.0528 | 0.5713 | 0.1069 | 0.3218 |
| | 0.4536 | 0.5051 | 0.0413 | 0.5672 | 0.0944 | 0.3384 |
| | 0.4434 | 0.5201 | 0.0365 | 0.5601 | 0.0927 | 0.3472 |
| | 0.4324 | 0.5367 | 0.0309 | 0.5569 | 0.0847 | 0.3584 |
| | 0.3476 | 0.6423 | 0.0101 | 0.5204 | 0.0501 | 0.4295 |
| | 0.3158 | 0.6768 | 0.0074 | 0.5067 | 0.0445 | 0.4488 |
| | 0.3051 | 0.6895 | 0.0054 | 0.4993 | 0.0371 | 0.4636 |
| | 0.2747 | 0.7211 | 0.0042 | 0.4769 | 0.0347 | 0.4884 |
| | 0.2340 | 0.7641 | 0.0019 | 0.4487 | 0.0267 | 0.5246 |
| 308.15 | 0.4737 | 0.4568 | 0.0695 | 0.5768 | 0.1345 | 0.2887 |
| | 0.4493 | 0.4967 | 0.0540 | 0.5737 | 0.1166 | 0.3097 |
| | 0.4239 | 0.5371 | 0.0390 | 0.5687 | 0.0975 | 0.3338 |
| | 0.3995 | 0.5721 | 0.0284 | 0.5594 | 0.0828 | 0.3578 |
| | 0.3663 | 0.6147 | 0.0190 | 0.5475 | 0.0702 | 0.3823 |
| | 0.3303 | 0.6579 | 0.0118 | 0.5276 | 0.0573 | 0.4151 |
| | 0.2737 | 0.7209 | 0.0054 | 0.4974 | 0.0404 | 0.4622 |
| | 0.2249 | 0.7722 | 0.0029 | 0.4590 | 0.0342 | 0.5068 |
| | 0.1901 | 0.8083 | 0.0016 | 0.4274 | 0.0303 | 0.5423 |
| | 0.1884 | 0.8100 | 0.0016 | 0.4276 | 0.0300 | 0.5424 |

Table2.Values of Parameters in Equation 1

| T/K | a | b | c | d | R ² |
|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| 288.15 | -0.189 | -2.344 | 0.325 | -7.381 | 0.9961 |
| 298.15 | -0.202 | -2.092 | -0.885 | -5.442 | 0.9993 |
| 308.15 | -0.180 | -1.483 | -3.411 | -1.497 | 0.9985 |

Table3. Values of Parameters in Equations 2 and 3

| T/K | eq.2 | | | eq.3 | | |
|--------|----------------|-------|----------------|----------------|-------|----------------|
| | k ₁ | n | R ² | k ₂ | r | R ² |
| 288.15 | 0.369 | 1.538 | 0.9991 | 1.714 | 0.593 | 0.9985 |
| 298.15 | 0.358 | 1.516 | 0.9995 | 1.775 | 0.613 | 0.9993 |
| 308.15 | 0.306 | 1.504 | 0.9998 | 1.967 | 0.628 | 0.9998 |

Table4. Deviations of LLE Correlations of the System water (1) + ethanol (2)
+ C₆H₅O₇K₃ (3) by Using Equations 1 and 2, Using Equations 1 and 3,
and Using Equations 2 and 3

| T/K | eqs. 1 and 2 | | | eqs. 1 and 3 | | |
|--------|--------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| | dev(1)[%] | dev(2)[%] | dev(3)[%] | dev(1)[%] | dev(2)[%] | dev(3)[%] |
| 288.15 | 0.21 | 0.13 | 0.19 | 0.21 | 0.27 | 0.24 |
| 298.15 | 0.12 | 0.33 | 0.29 | 0.14 | 0.39 | 0.31 |
| 308.15 | 0.16 | 0.23 | 0.30 | 0.11 | 0.39 | 0.33 |
| avdev | 0.22 | | | 0.26 | | |

| T/K | eqs. 1 and 2 | | |
|--------|--------------|-----------|-----------|
| | dev(1)[%] | dev(2)[%] | dev(3)[%] |
| 288.15 | 0.21 | 0.28 | 0.23 |
| 298.15 | 0.13 | 0.17 | 0.15 |
| 308.15 | 0.13 | 0.24 | 0.26 |
| avdev | 0.20 | | |

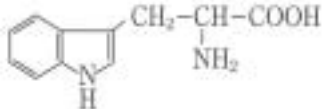
Table5. Solubility Saturated and Crystal State of Five Salts
in Aqueous Solution at 298.2K^{9),10)}

| Salts | Solubility | |
|---|--|---------------------------|
| | Mass Fraction of Salt in Aqueous Solution | Hydrate Number of Crystal |
| Cs ₂ SO ₄ | 0.645,0.634(273.0K) | 0(anhydrous) |
| C ₆ H ₅ O ₇ K ₃ | 0.625(288.2K) | 1 |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.485 | 2 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.620 | 3 |
| K ₂ CO ₃ | 0.529 | 3/2 |

Table6. LLE for the System water (1) + ethanol (2) + C₆H₅O₇K₃ (3) + amino acids (4)

| Top phase | | | | Bottom phase | | | | K |
|----------------|----------------|----------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------------|-------|
| w ₁ | w ₂ | w ₃ | w ₄ ×10 ⁴ | w ₁ | w ₂ | w ₃ | w ₄ ×10 ⁴ | |
| Gly | | | | | | | | |
| 0.4914 | 0.4310 | 0.0776 | 0.079 | 0.5724 | 0.1405 | 0.2871 | 0.212 | 0.372 |
| 0.4510 | 0.4591 | 0.0899 | 0.066 | 0.5733 | 0.1534 | 0.2733 | 0.196 | 0.334 |
| 0.3388 | 0.6479 | 0.0133 | 0.019 | 0.5245 | 0.0621 | 0.4134 | 0.229 | 0.084 |
| 0.3296 | 0.6571 | 0.0133 | 0.020 | 0.5123 | 0.0529 | 0.4348 | 0.242 | 0.082 |
| 0.2964 | 0.6929 | 0.0107 | 0.017 | 0.5157 | 0.0593 | 0.4250 | 0.230 | 0.076 |
| 0.2835 | 0.7108 | 0.0057 | 0.018 | 0.4917 | 0.0434 | 0.4649 | 0.304 | 0.058 |
| 0.2413 | 0.7553 | 0.0034 | 0.011 | 0.4719 | 0.0370 | 0.4911 | 0.278 | 0.040 |
| 0.2211 | 0.7770 | 0.0019 | 0.014 | 0.4418 | 0.0297 | 0.5285 | 0.409 | 0.035 |
| 0.2009 | 0.7964 | 0.0027 | 0.012 | 0.4610 | 0.0336 | 0.5054 | 0.316 | 0.038 |
| 0.1950 | 0.8024 | 0.0026 | 0.011 | 0.4553 | 0.0340 | 0.5107 | 0.329 | 0.035 |
| Leu | | | | | | | | |
| 0.5201 | 0.3919 | 0.0880 | 0.256 | 0.5749 | 0.1499 | 0.2752 | 0.187 | 1.369 |
| 0.4728 | 0.4948 | 0.0324 | 0.247 | 0.5539 | 0.0899 | 0.3562 | 0.124 | 1.986 |
| 0.3310 | 0.6541 | 0.0149 | 0.267 | 0.5254 | 0.0695 | 0.4051 | 0.105 | 2.540 |
| 0.2393 | 0.7539 | 0.0068 | 0.283 | 0.4889 | 0.0606 | 0.4505 | 0.083 | 3.392 |
| 0.1522 | 0.8467 | 0.0011 | 0.300 | 0.4216 | 0.0225 | 0.5559 | 0.041 | 7.246 |
| Gln | | | | | | | | |
| 0.5272 | 0.3929 | 0.0799 | 0.138 | 0.5731 | 0.1427 | 0.2842 | 0.331 | 0.419 |
| 0.4765 | 0.4707 | 0.0528 | 0.140 | 0.5669 | 0.1090 | 0.3241 | 0.376 | 0.372 |
| 0.4560 | 0.5145 | 0.0295 | 0.102 | 0.5541 | 0.0837 | 0.3622 | 0.392 | 0.260 |
| 0.3717 | 0.6154 | 0.0129 | 0.075 | 0.5275 | 0.0585 | 0.4140 | 0.418 | 0.180 |
| 0.3012 | 0.6894 | 0.0094 | 0.080 | 0.5129 | 0.0547 | 0.4324 | 0.463 | 0.173 |
| 0.2573 | 0.7372 | 0.0055 | 0.074 | 0.4955 | 0.0422 | 0.4623 | 0.559 | 0.133 |
| 0.1941 | 0.8043 | 0.0016 | 0.068 | 0.4417 | 0.0269 | 0.5314 | 0.661 | 0.102 |
| 0.1784 | 0.8203 | 0.0013 | 0.054 | 0.4305 | 0.0254 | 0.5441 | 0.577 | 0.094 |
| Trp | | | | | | | | |
| 0.5037 | 0.4073 | 0.0890 | 0.666 | 0.5742 | 0.1516 | 0.2742 | 0.368 | 1.810 |
| 0.4772 | 0.4603 | 0.0625 | 0.646 | 0.5692 | 0.1210 | 0.3098 | 0.286 | 2.259 |
| 0.4377 | 0.5320 | 0.0303 | 0.754 | 0.5498 | 0.0899 | 0.3603 | 0.257 | 2.934 |
| 0.3083 | 0.6812 | 0.0105 | 0.781 | 0.5187 | 0.0547 | 0.4266 | 0.171 | 4.557 |
| 0.1912 | 0.8069 | 0.0019 | 0.713 | 0.4426 | 0.0282 | 0.5292 | 0.104 | 6.834 |
| 0.1745 | 0.8240 | 0.0015 | 0.752 | 0.4329 | 0.0245 | 0.5426 | 0.103 | 7.300 |
| Arg | | | | | | | | |
| 0.5014 | 0.4143 | 0.0843 | 0.161 | 0.5756 | 0.1432 | 0.2812 | 0.414 | 0.390 |
| 0.4354 | 0.5346 | 0.0300 | 0.058 | 0.5534 | 0.0860 | 0.3606 | 0.519 | 0.111 |
| 0.2871 | 0.7041 | 0.0088 | 0.024 | 0.5102 | 0.0527 | 0.4371 | 0.571 | 0.043 |
| 0.2516 | 0.7427 | 0.0057 | 0.026 | 0.4969 | 0.0423 | 0.4608 | 0.755 | 0.035 |
| 0.2044 | 0.7924 | 0.0032 | 0.019 | 0.4738 | 0.0337 | 0.4925 | 0.739 | 0.026 |

Table 7. Amino acids¹¹⁾

| Name | Structural Formula | Solubility(g/100g water) | Isoelectric Point | Classification |
|------------|---|--------------------------|-------------------|------------------------------|
| Glycine | $\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ | 22.5 | 5.97 | neutral amino acid |
| Leucine | $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ | 2.38 | 5.98 | neutral amino acid |
| Glutamine | $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ | 3.78 | 5.65 | acidic amino acid (amide) |
| Tryptophan |  | 1.06 | 5.89 | cyclic amino acid |
| Arginine | $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH} \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ | 14.8 | 11.15 | basic amino acid |

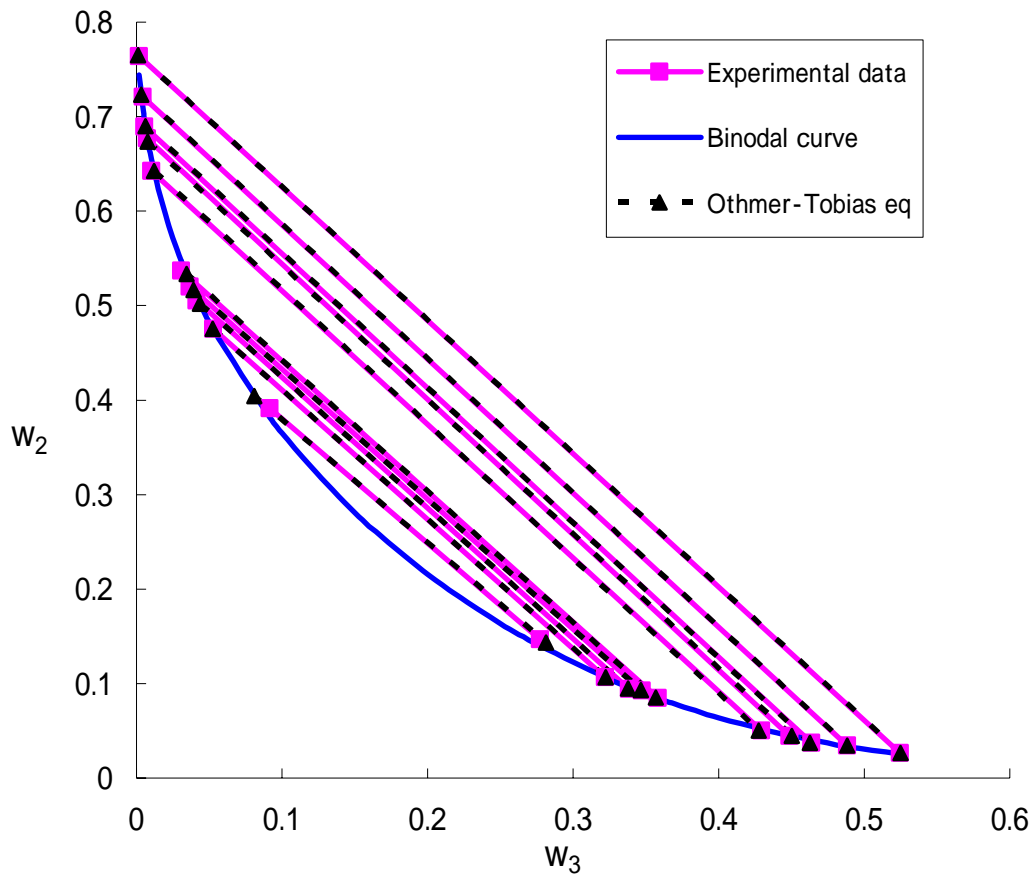


Fig.3 Comparison of experimental and calculated LLE of the system
water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$ at 298.15K.

The binodal curve and tie lines were correlated using eqs.1 and 2

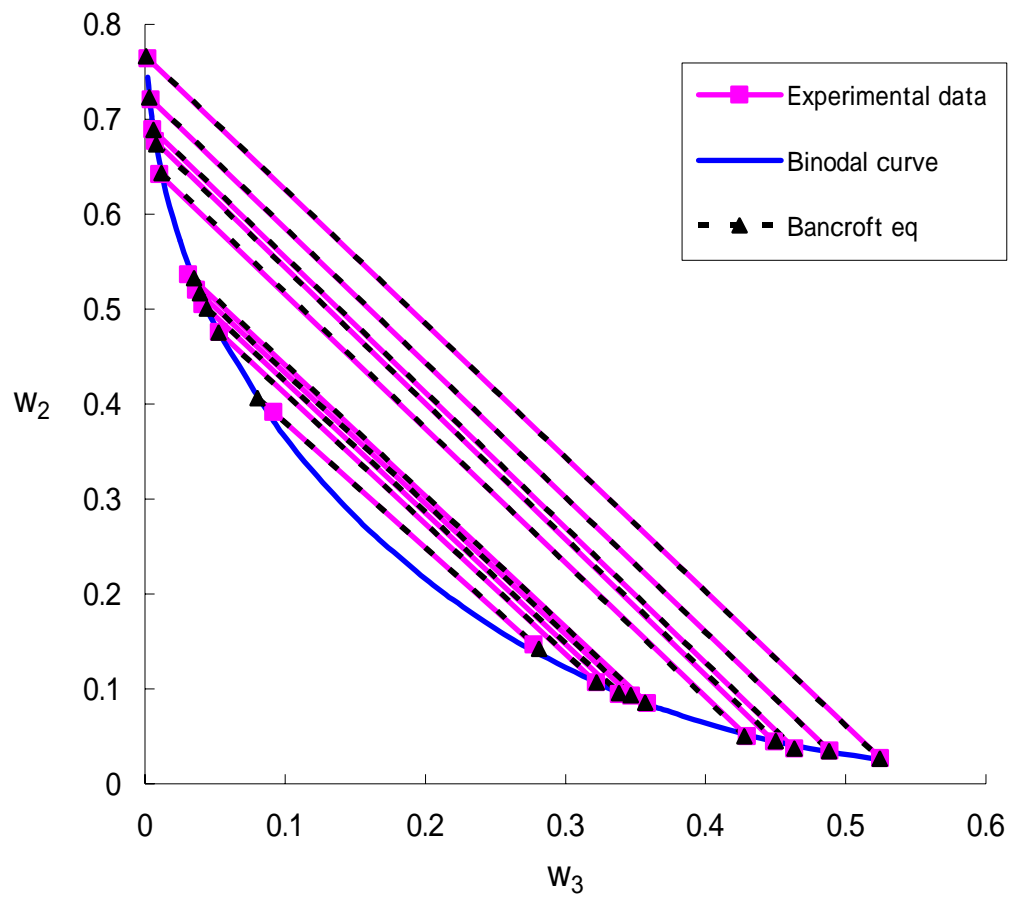


Fig.4 Comparison of experimental and calculated LLE of the system
water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$ at 298.15K.

The binodal curve and tie lines were correlated using eqs.1 and 3

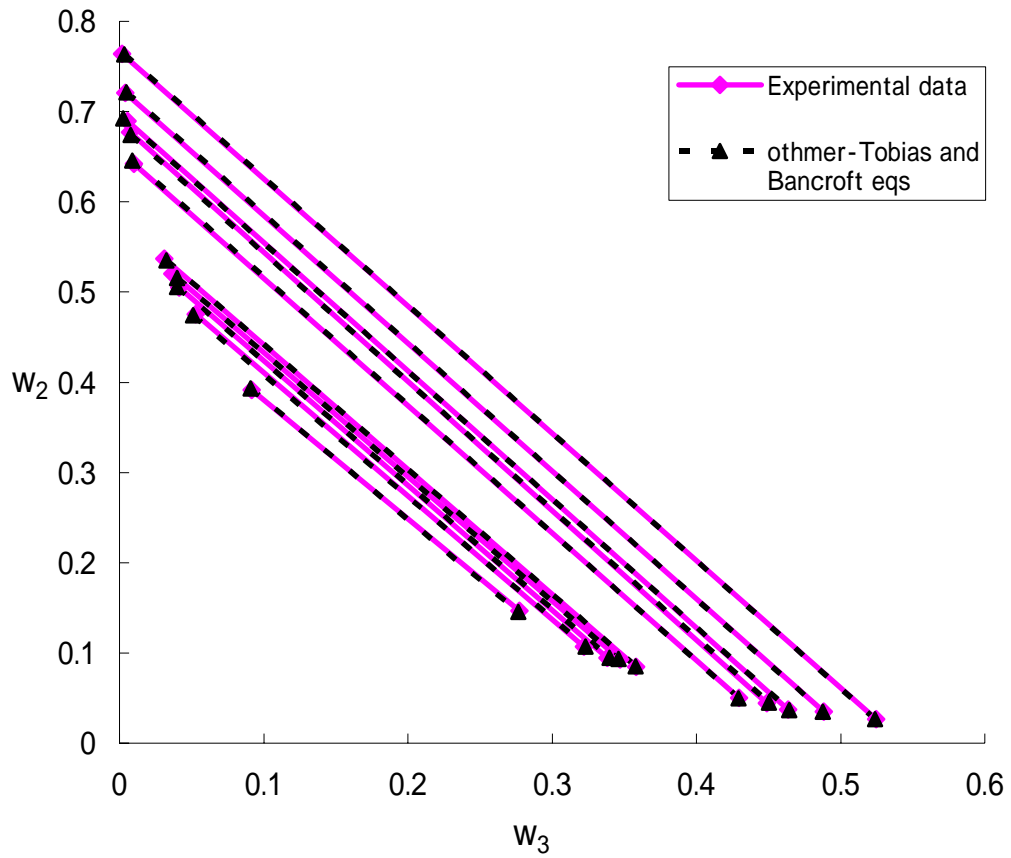


Fig.5 Comparison of experimental and calculated LLE of the system
 water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$ at 298.15K.
 Tie lines were correlated using eqs.2 and 3

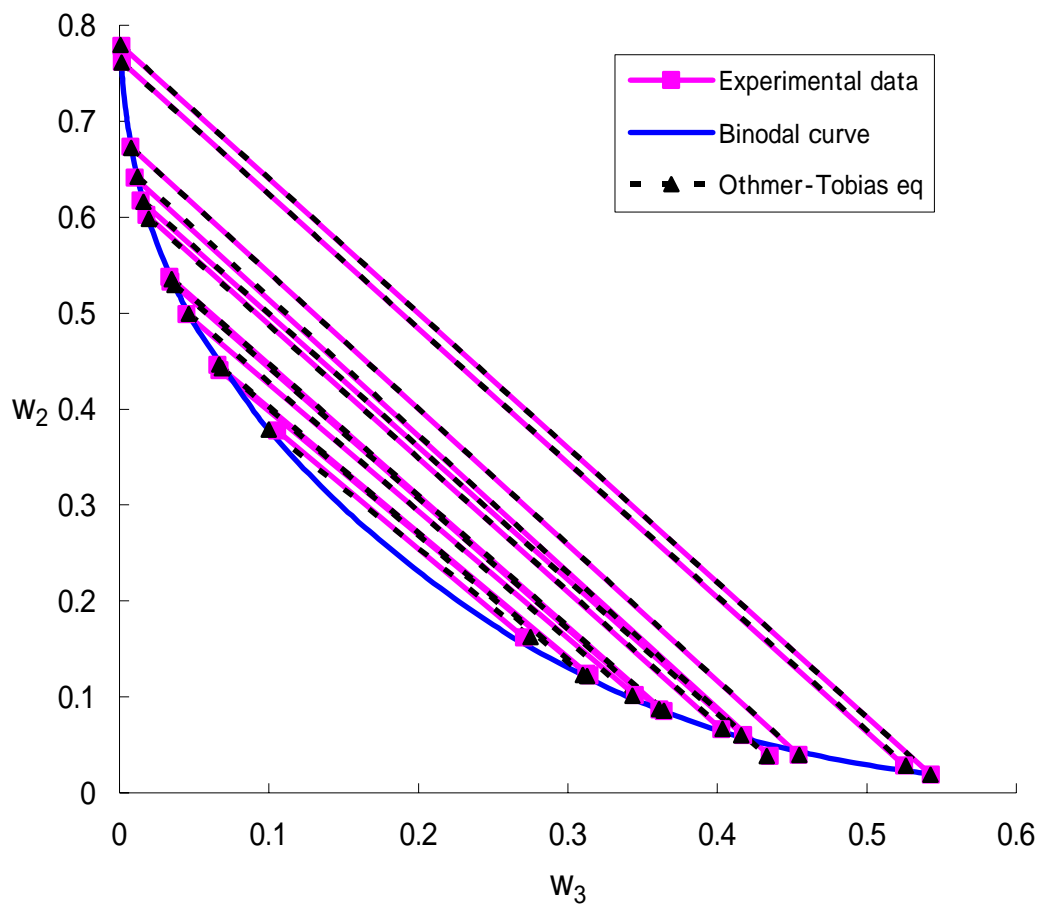


Fig.6 Comparison of experimental and calculated LLE of the system
 water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$ at 288.15K.

The binodal curve and tie lines were correlated using eqs.1 and 2

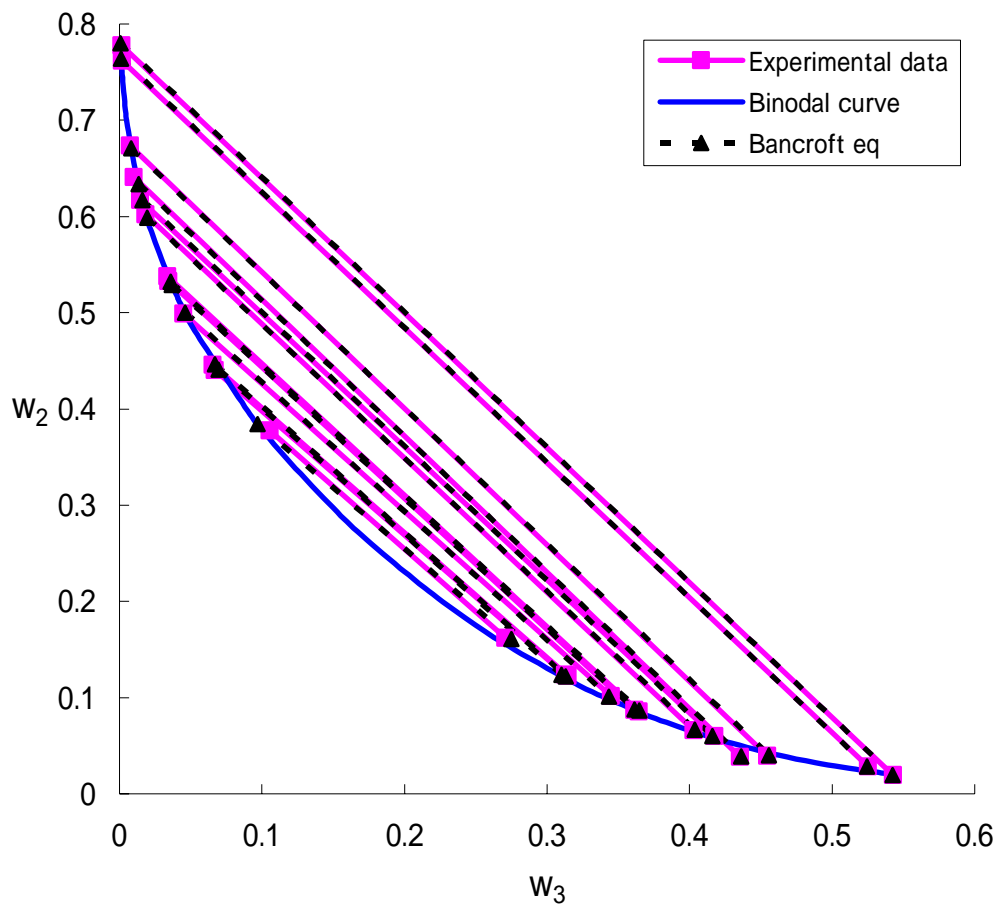


Fig.7 Comparison of experimental and calculated LLE of the system
water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$ at 288.15K.

The binodal curve and tie lines were correlated using eqs.1 and 3

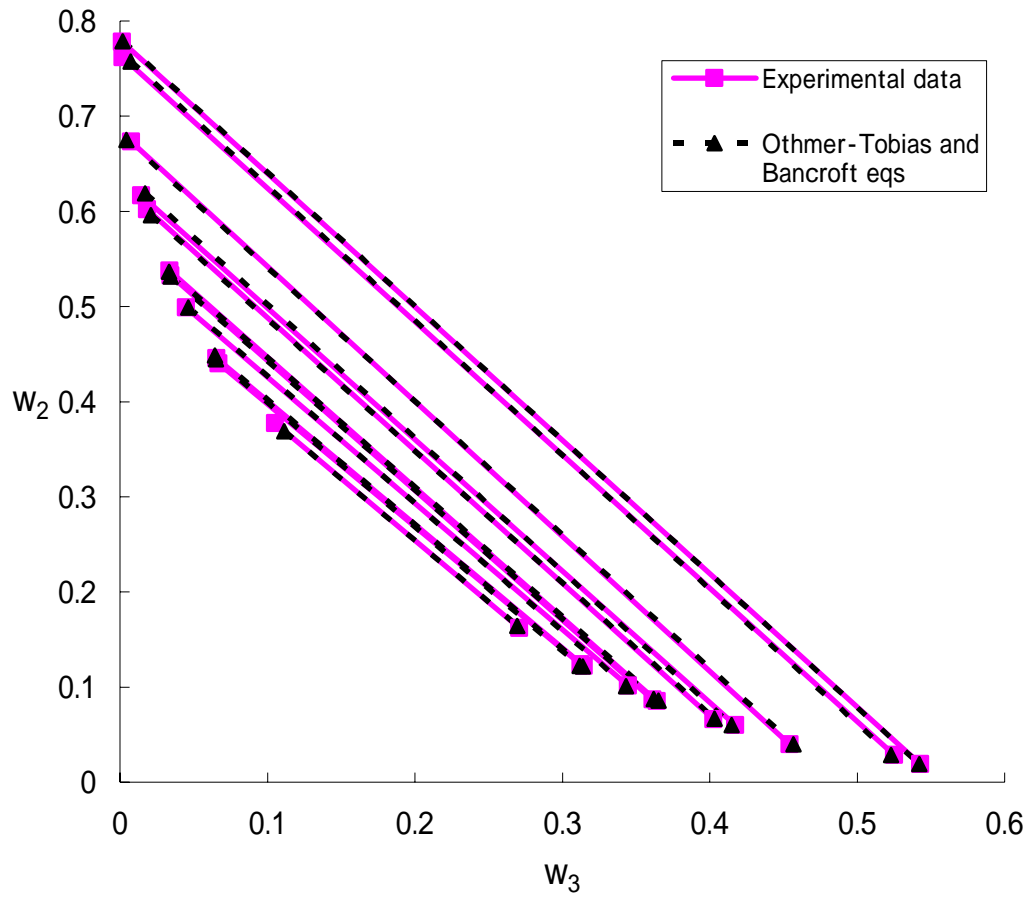


Fig.8 Comparison of experimental and calculated LLE of the system
 water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$ at 288.15K.
 Tie lines were correlated using eqs.2 and 3

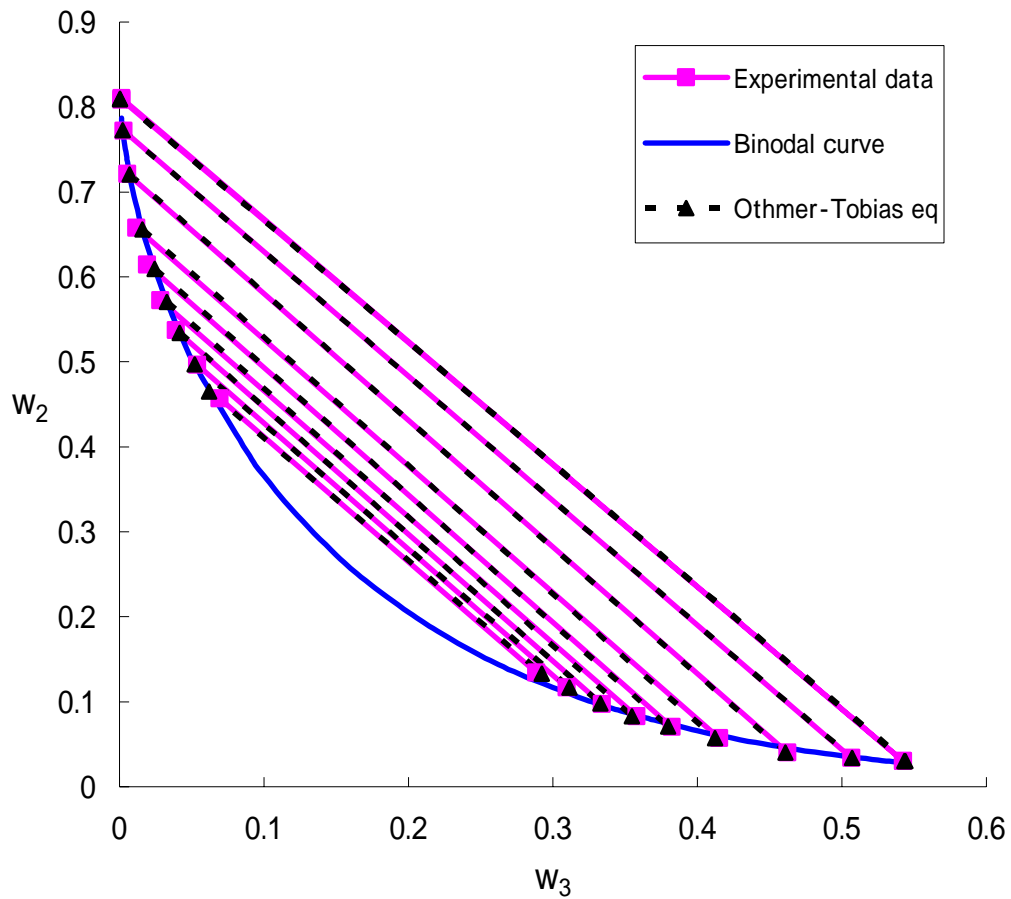


Fig.9 Comparison of experimental and calculated LLE of the system
 water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$ at 308.15K.

The binodal curve and tie lines were correlated using eqs.1 and 2

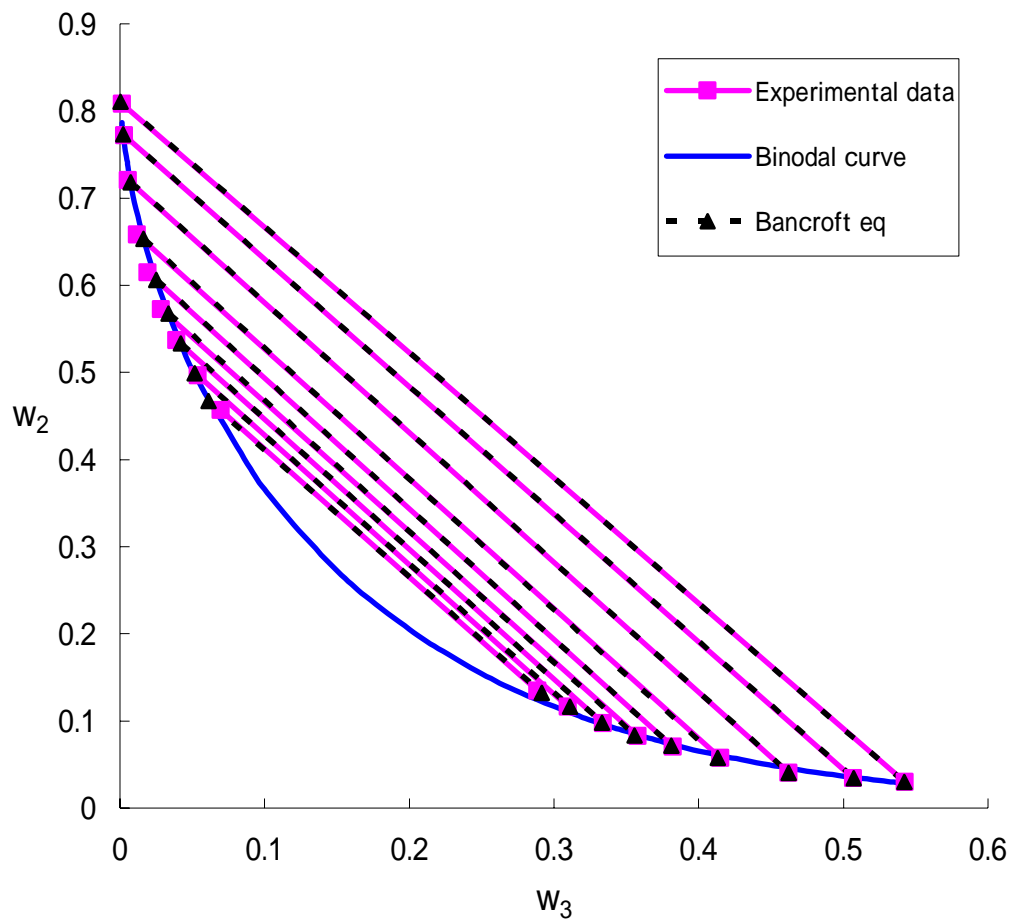


Fig.10 Comparison of experimental and calculated LLE of the system
water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$ at 308.15K.

The binodal curve and tie lines were correlated using eqs.1 and 3

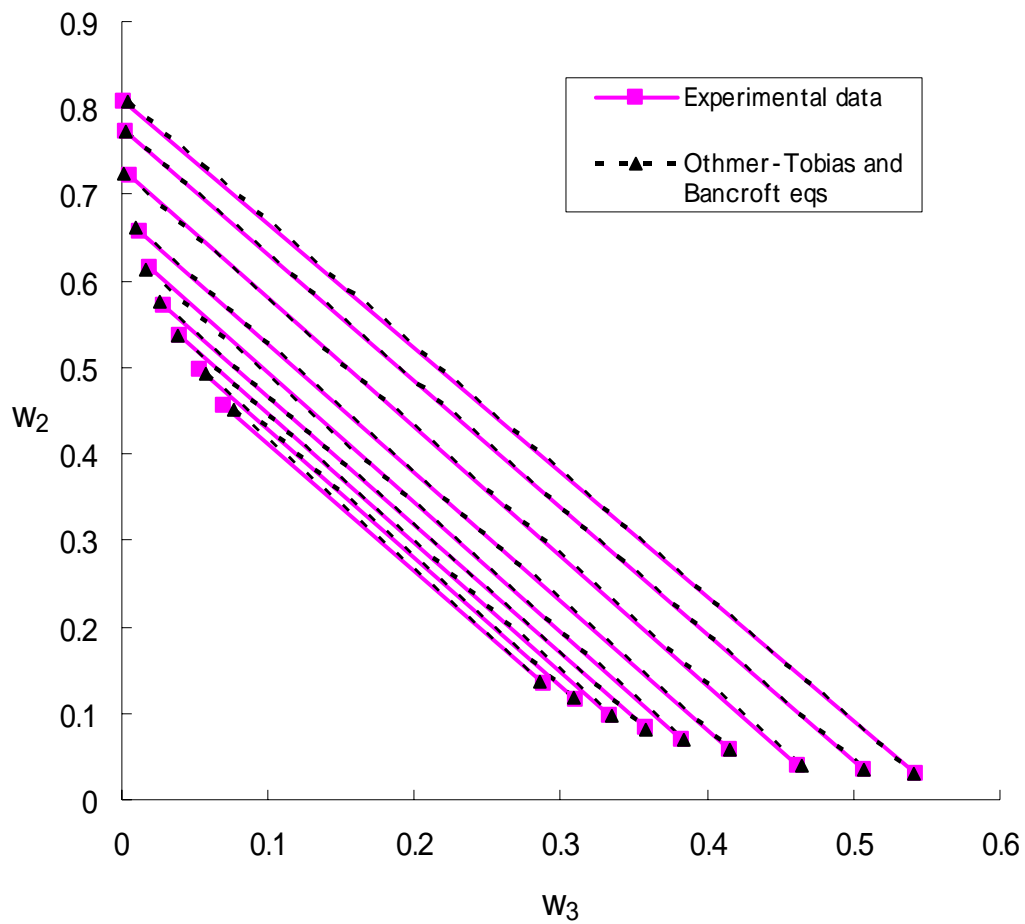


Fig.11 Comparison of experimental and calculated LLE of the system
 water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$ at 308.15K.
 Tie lines were correlated using eqs.2 and 3

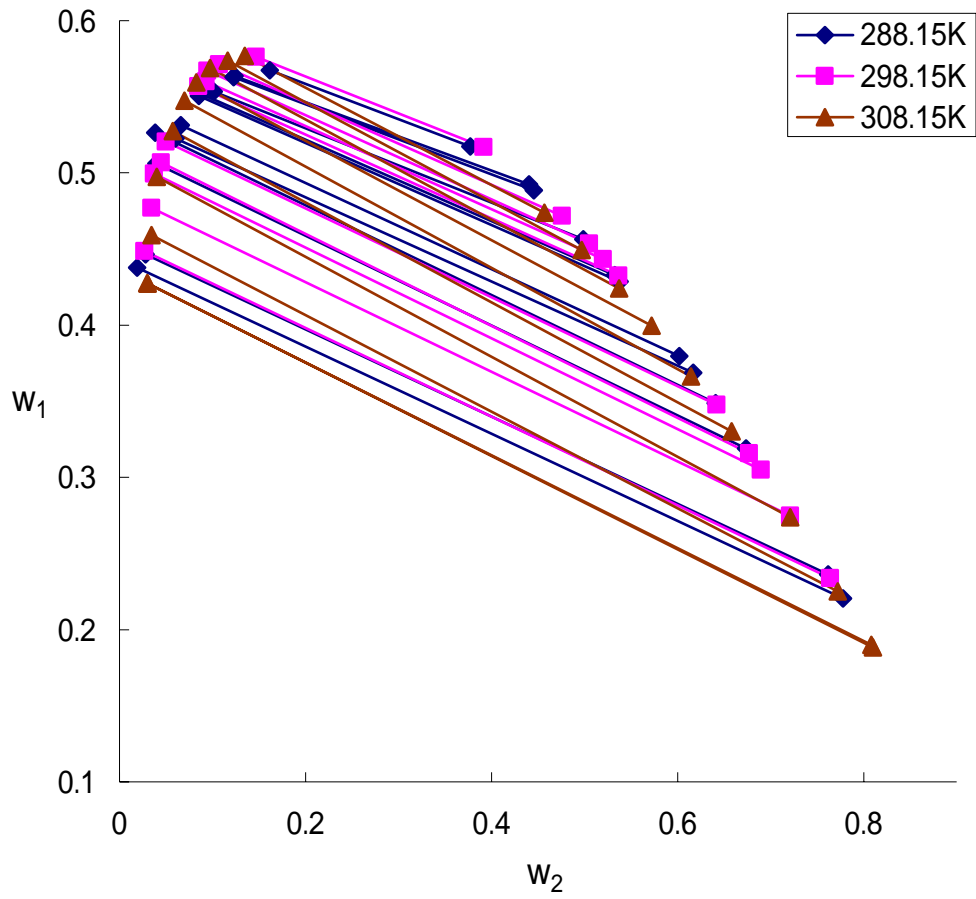


Fig.12 Comparison of tie lines for the system water + ethanol + $C_6H_5O_7K_3$

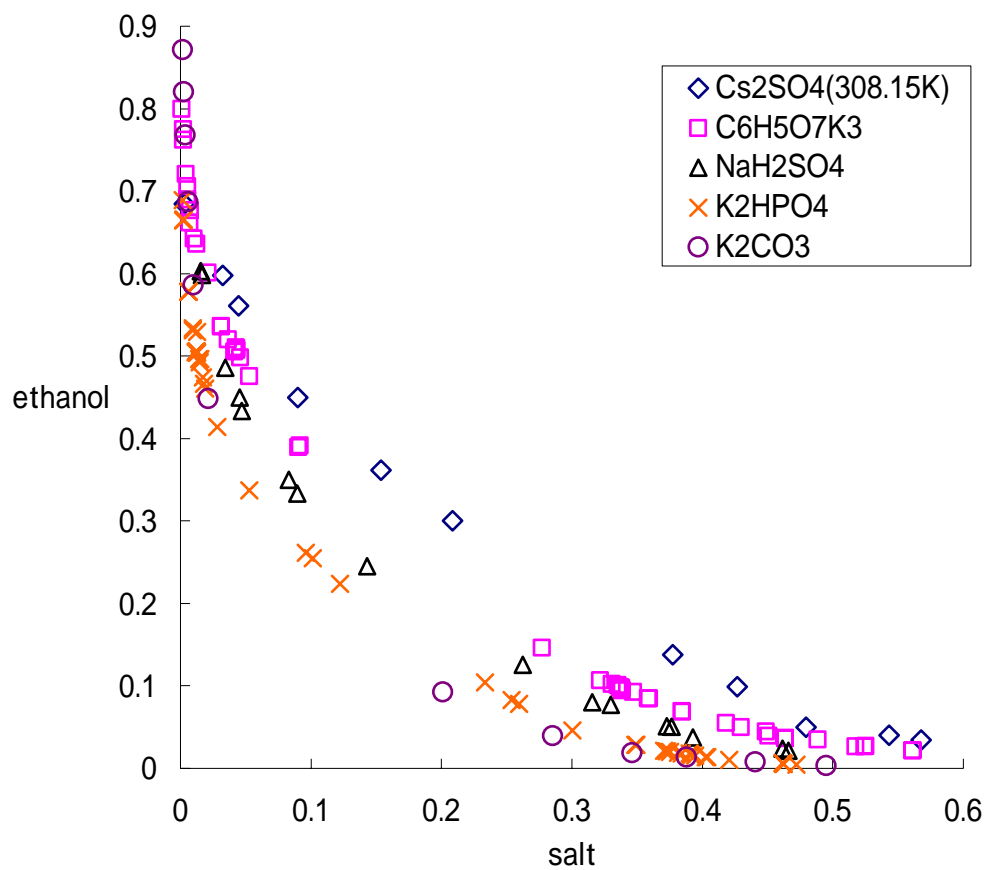


Fig.13 Comparison of LLE of the ternary systems
 water + ethanol + salt ($\text{Cs}_2\text{SO}_4, \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{K}_3, \text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{K}_2\text{HPO}_4, \text{or } \text{K}_2\text{CO}_3$)

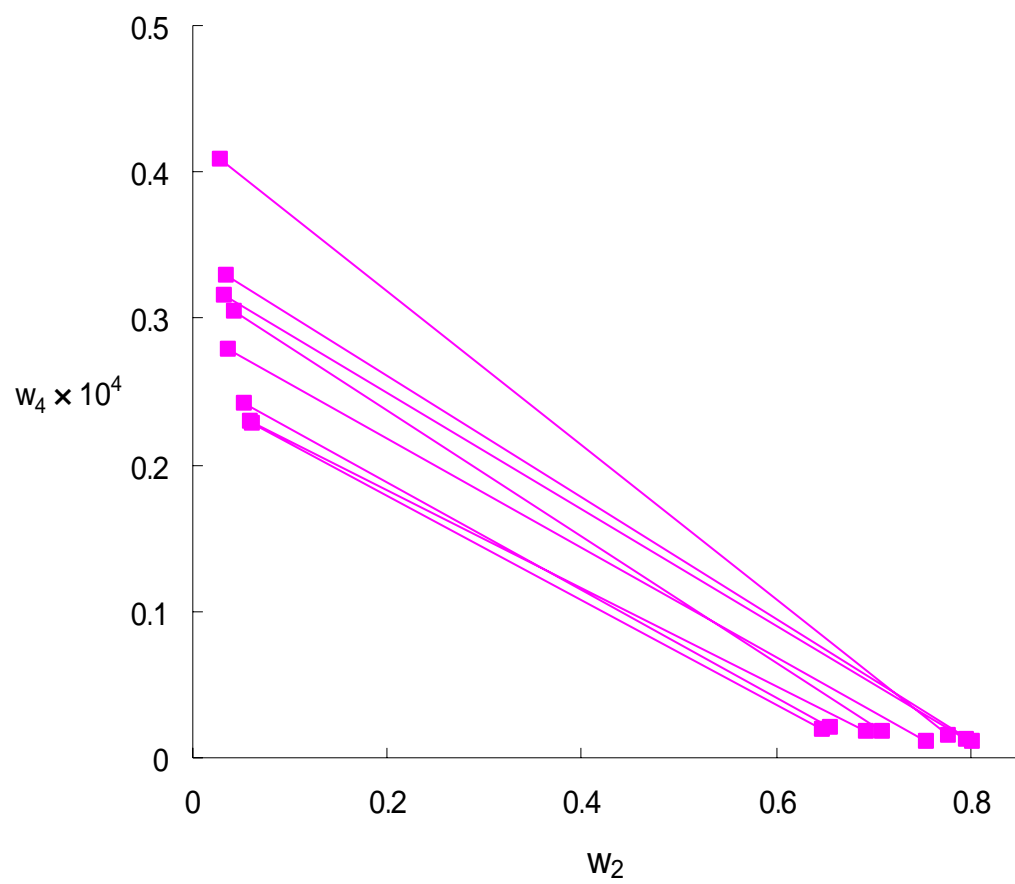


Fig.14 Relation between Gly and ethanol for the quaternary system at 298.15K

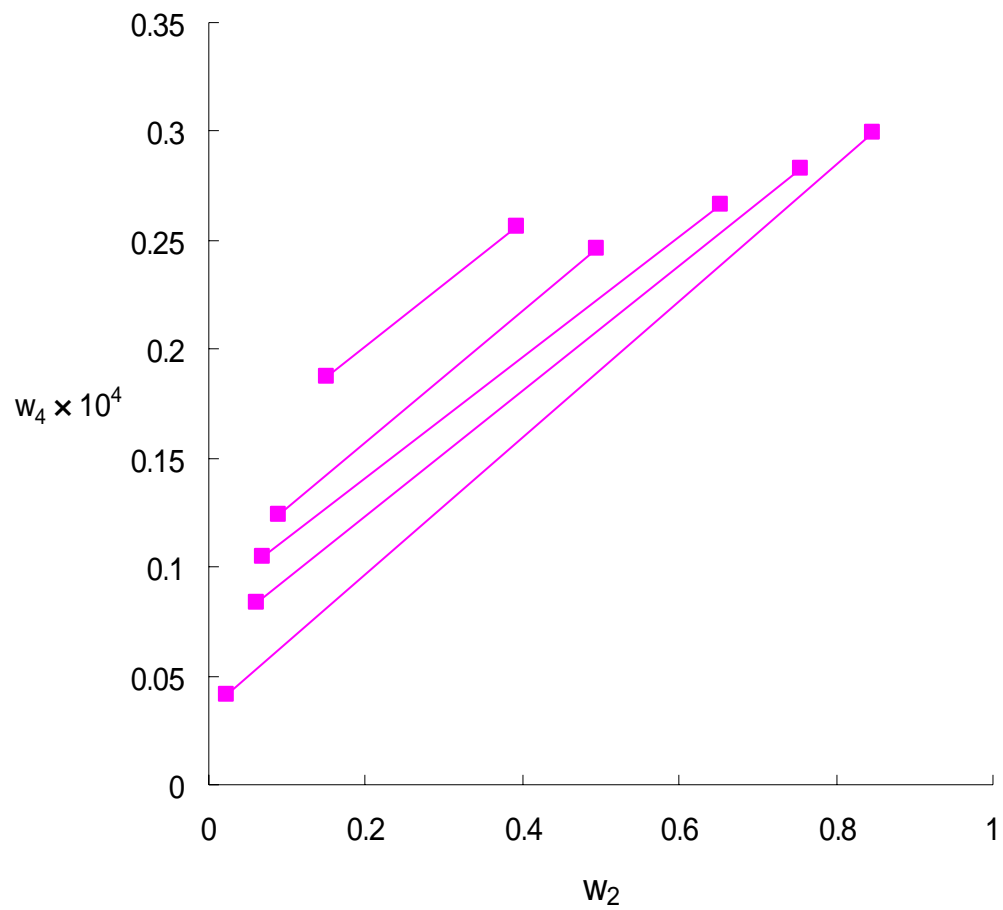


Fig.15 Relation between Leu and ethanol for the quaternary system at 298.15K

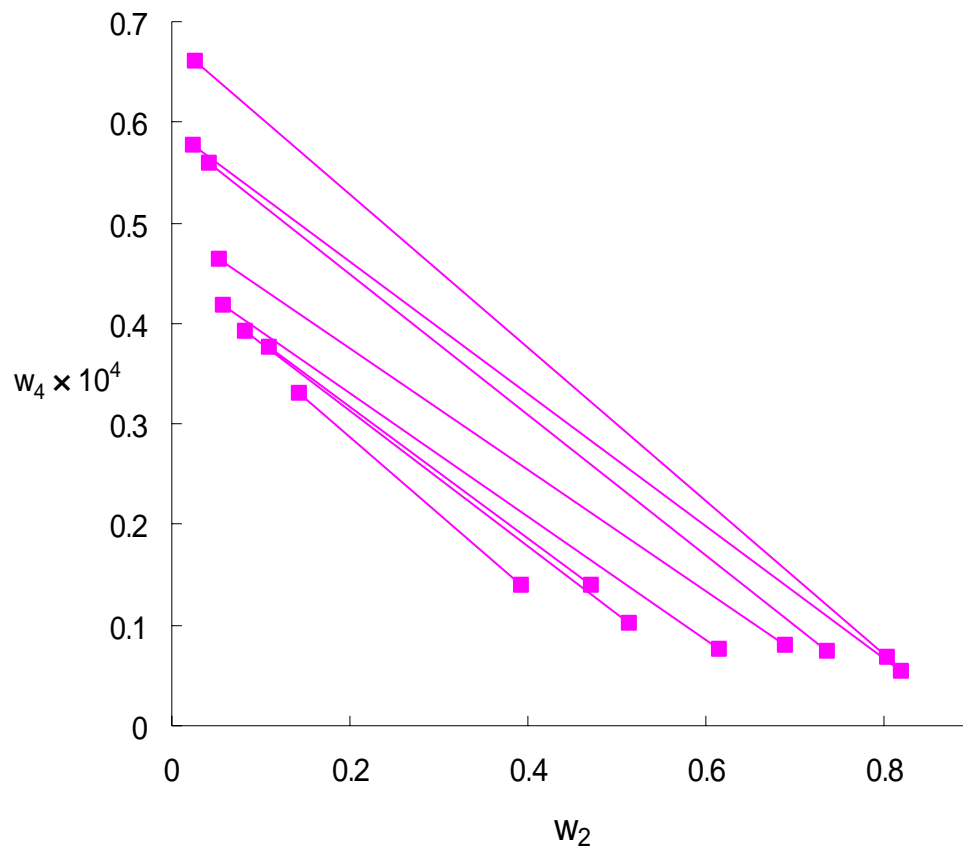


Fig.16 Relation between Gln and ethanol for the quaternary system at 298.15K

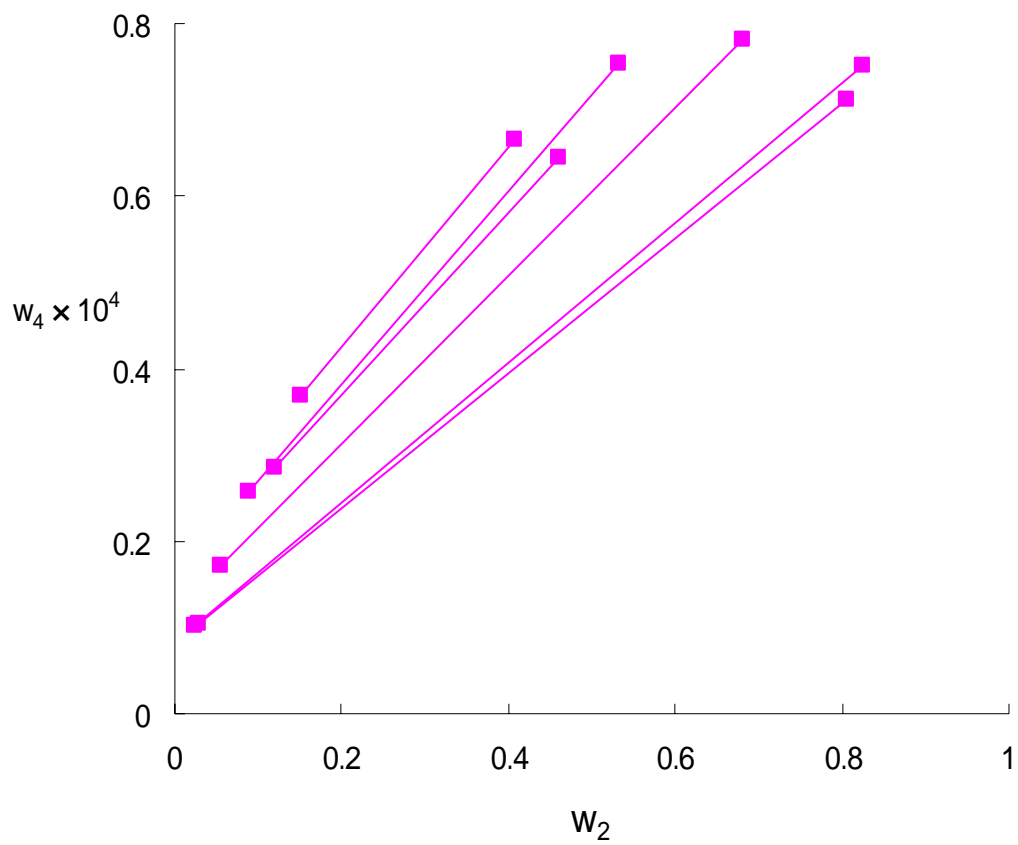


Fig.17 Relation between Trp and ethanol for the quaternary system at 298.15K

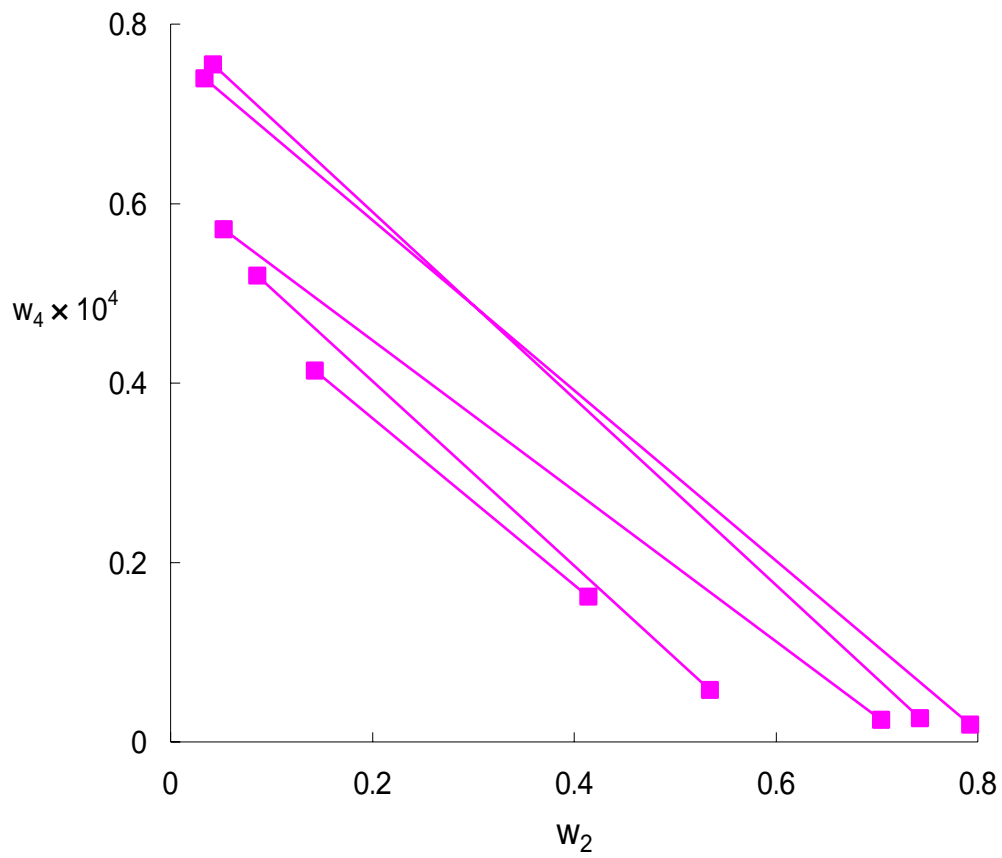


Fig.18 Relation between Arg and ethanol for the quaternary system at 298.15K

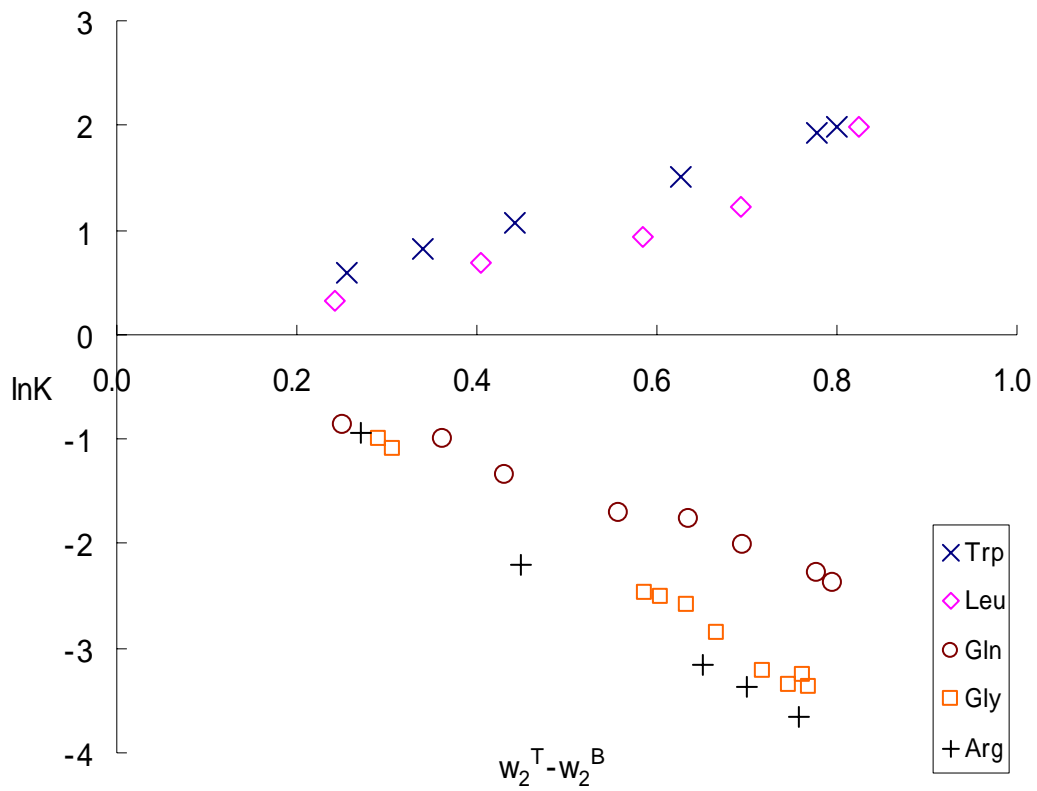


Fig.19 Partition coefficients K of amino acids in quaternary system plotted against the difference of the ethanol (w/w) between the top and bottom phases, respectively

5. 結言

5.1 水 + エタノール + クエン酸三カリウム三成分系液液平衡の測定

- 水 + エタノール + $C_6H_5O_7K_3$ 三成分系液液平衡の測定を 288.15K、298.15K、308.15K の各温度で行い、溶解度曲線及びタイラインを決定した。
- 測定値から非線形方程式，Othmer-Tobias 式及び Bancroft 式のパラメーターを R^2 値 0.9961~0.9998 の精度で決定することができた。
- L L E の測定結果は、非線形方程式，Othmer-Tobias 式及び Bancroft 式のいずれの 2 式を使用しても、精度よく相関することができた。
- タイラインの温度による変化は、若干ではあるが温度が高くなるにつれて傾きが急になる傾向がみられた。また溶解度曲線の温度による変化はほとんど見られなかった。
- クエン酸三カリウムは水 + エタノール系において二相分離を引き起こし、エタノール濃度差の大きい二相を形成することが分かった。

5.2 アミノ酸の分配係数の測定

- 水 + エタノール + $C_6H_5O_7K_3$ 系に各種アミノ酸(Gly, Leu, Gln, Trp 及び Arg)を加えた四成分系液液平衡の測定を 298.15K において行い、分配特性を調べた。
- Gln, Gly 及び Arg は下相(Water rich)に、Trp 及び Leu は上相 (Ethanol rich)に多く分配することが分かった。
- 分配係数の大小関係は $Arg < Gly < Gln < Leu < Trp$ となった。これはアミノ酸の水に対する溶解度や、アミノ酸の構造等の違いによるものと考えられる。
- 各種アミノ酸により分配係数が異なり、本系がアミノ酸の選択的な抽出ができる系だと分かった。

参考文献

- 1) 化学工学会編 「最近の化学工学 47 抽出」 化学工業社 p115 ~ 116 (1995)
- 2) Hu,M.;Zhai,Q.;Liu,Z.;Xia,s.Liquid-Liquid and Solid-Liquid Equilibrium of the Ternary System Ethanol+Cesium Sulfate+Water at (10,30,and50) .J.Chem.Eng.Data 2003,48,1561-1564
- 3) Salabat,A.;Hashemi,M.Temperature Effect on the Liquid-Liquid Equilibria for Some Aliphatic Alcohols+K₂CO₃.J.Chem.Eng.Data 2006,51,1194-1197
- 4) 宮原真二,法政大学大学院修士論文 (2004)
- 5) 相良紘 「分離精製技術入門」 培風館 p72 ~ 73 (1998)
- 6) 中西一宏,白神直弘,米本年邦,崎山高明 「生物分離工学」講談社サイエンティック P2 ~ 3, p15 ~ 18 (1997)
- 7) 日本化学会編 「教師と学生のための化学実験」東京化学同人 p9 ~ 11,p15 ~ 18 (1987)
- 8) R. Hatti-Kaul, ed., Aqueous Two-phase systems: Method and Protocols, p95-105, Humama Press Inc, Totowa, NJ (2000)
- 9) 日本化学会編 「改訂 3 版 化学便覧 基礎編」丸善 p168,p170,p173 (1984)
- 10) 化学大辞典編集委員会 「化学大辞典 3」 共立出版 p23 (1984)
- 11) 味の素株式会社編 「アミノ酸ハンドブック」 工業調査会 p8 ~ 9,p126,p150, p158 ~ 159,p164 (2003)

謝辞

本研究の実験、分析などの多岐に渡り、懇切丁寧にご協力を賜りました物質化学科、片山寛武教授、終始相談に乗って頂いた片山研究室修士課程、加藤氏、ご協力頂きました片山研究室卒業生、上永田氏、堀くん、青木さん、石川くん、中井川さん、長谷川さん、及び片山研究室、石橋くん、佐藤雄亮くん、佐藤佑太くん、柘植くん、薮島くん、山口くん
に深く感謝致します。