

環境サンプル測定のためのリン酸マイクロセンサーの開発

北海道大学大学院工学院 学生会員 ○宮崎悠爾, 正会員 押木守
北海道大学大学院工学研究院 正会員 高橋 正宏, 岡部 聡, 佐藤 久

1. はじめに: マイクロセンサーは、現在のところ最も非侵襲的にサンプル内の物質濃度を定量できるツールの一つである。今までに開発されたマイクロセンサーは 30 種類以上存在する¹⁻³⁾。環境工学分野では炭素循環と窒素循環の解析が重要であるため、 O_2 , pH, HCO_3^- , CH_4 , NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , N_2O , NO 等のマイクロセンサーが開発されてきた。これに対し、炭素や窒素と同様に環境工学分野で重要な元素であるリンに関するマイクロセンサーの開発は遅れている。リン酸は栄養塩である、生物学的処理プロセスの微生物の増殖に影響を及ぼす因子である、といった理由からその挙動を把握することは極めて重要である。リン酸は多くの窒素化合物と同様に、生物膜内などのマイクロな領域において濃度が時間的にも空間的にも著しく変動していると考えられる。このようなマイクロ領域のリン酸濃度を定量するためにはリン酸マイクロセンサーの開発が不可欠である。Lee et al.はコバルト線表面でリン酸の酸化還元反応を起こすことによりリン酸濃度を定量するリン酸マイクロセンサーを開発した¹⁾。このセンサーは検出原理が酸化還元反応に基づくため、溶存酸素(DO)やアルカリ度($CaCO_3$)が妨害物質となった。DOやアルカリ度は生物膜サンプルの測定時に変動する可能性が高く、これらの物質の妨害をより受けにくいリン酸マイクロセンサーの開発が不可欠である。そこで本研究では、このセンサーとは測定原理が異なる、イオン選択性液膜(Liquid Ion eXchanger; LIX)を用いたリン酸マイクロセンサーの開発を試みた。開発後、既往のリン酸マイクロセンサーと性能を比較するため、センサーの特性(検量線、選択係数、レスポンスタイム、安定性、流速の影響)を評価した。

2. 実験方法: LIX型リン酸マイクロセンサーは de Beer et al.²⁾および Gieseke and de Beer³⁾の方法に準拠して作製した。本研究では2種類のLIXを用いた。*o*-nitrophenyl octyl ether ((株)同仁化学研究所)に、4%(w/w)となるようにイオノフォア(tributyltin chloride, 和光純薬工業株式会社)を、イオノフォアに対してモル比で25%となるようにsodium tetrakis [3,5-bis(trifluoromethyl)-phenyl]borate (Fluka)を添加したLIXを、LIX-BUと称する⁴⁾。*o*-nitrophenyl octyl ether ((株)同仁化学研究所)に、3%(w/w)となるようにイオノフォア(Tribenzyltin chloride, 和光純薬工業株式会社)を添加したLIXを、LIX-BEと称する⁵⁾。検量線は総リン酸(リン酸の化学種 H_3PO_4 , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} の総和、T- PO_4 と記す)の濃度を0.1 μM から10 mMの範囲内で6段階に調整したリン酸標準溶液を用いた。T- PO_4 濃度はStandard Methodsに従って測定した。センサーの起電力(EMF)はpH計(pH/ION METER F-23, 堀場製作所)を用いて測定した。

3. 結果及び考察: Figure 1にLIX-BUを用いたリン酸マイクロセンサーの検量線を示した。検量線は4本のセンサーを用い5回測定した。検量線は HPO_4^{2-} 濃度が38 μM から3.6 mMの範囲で直線となった($r^2=0.99$)。検量線の傾きは $-4 \text{ mV}/\log(HPO_4^{2-})$ から $-14 \text{ mV}/\log(HPO_4^{2-})$ の範囲内にあり、平均値は $-11 \text{ mV}/\log(HPO_4^{2-})$ であり、全ての傾きがネルンストの式から求められる理論値($-29 \text{ mV}/\log(HPO_4^{2-})$)よりも緩やかだった。本研究室では約15年に渡り様々なLIX型イオンセンサー(pH, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 等)を作製してきた。これらの検量線の傾きの絶対値は概して理論値よりも緩やかな傾向がある。本研究で新たに開発したリン酸センサーにも同様の傾向がみられた。検量線の傾きが緩やかな場合、センサーのS/N比が低下しノイズの影響が大きくなる。そのため、検量線の傾きは大きいことが望ましい。そこで、検量線の傾きを理論値に近づけるため、イオノフォアの種類を変更したLIX-BEを作製し、その性能を検討した。

LIX-BEを用いた5本のリン酸マイクロセンサーについてそれぞれ検量線を作製し、検量線の傾きを調べた(Figure 1)。検量線は HPO_4^{2-} 濃度が4.4 μM から4.7 mMの範囲で直線となった($r^2=0.99$)。検量線の傾きは $-21 \text{ mV}/\log(HPO_4^{2-})$ から $-29 \text{ mV}/\log(HPO_4^{2-})$ の範囲内にあり、平均値は $-25 \text{ mV}/\log(HPO_4^{2-})$ であり、ネルンストの式から求められる理論値($-29 \text{ mV}/\log(HPO_4^{2-})$)に近い値となった。

キーワード リン酸, マイクロセンサー, 検量線, レスポンスタイム, 妨害イオン

連絡先 〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目 北海道大学大学院工学研究院 TEL: 011-706-6277

LIX-BE を用いたセンサーに及ぼす妨害イオンの影響を検討した (Figure 2). Milli-Q 水に妨害イオンとなる可能性のあるイオンを1種類のみ添加し, EMFを測定した. 1 mM 以下の濃度範囲ではセンサーは NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} イオンに反応しなかった. これに対し, センサーは Cl^- , OH^- および HCO_3^- イオン濃度の増大に伴い EMF が低下した. HCO_3^- イオンに対する検量線の傾きは $-26 \text{ mV}/\log(\text{HCO}_3^-)$ であり, この値は HPO_4^{2-} イオンに対する検量線の傾き $-23 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ よりも高くなった. この結果から, LIX-BE を用いたリン酸マイクロセンサーは, HPO_4^{2-} よりも HCO_3^- イオンや Cl^- イオン, pH に対する選択性が高いことが明らかとなった.

Figure 3 にリン酸マイクロセンサーの T- PO_4 濃度の変化に対するレスポンスを示した. センサーは T- PO_4 濃度の変化に対し短時間で応答した. この結果から, 90% レスポンスタイムは 60s, ドリフトは約 $2 \text{ mV}/\text{h}$ であることが明らかとなった.

次に, LIX-BU を用いたセンサーに及ぼす妨害イオンの影響を検討した. 1 mM 以下の濃度範囲では, リン酸マイクロセンサーは Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} イオンの妨害は受けなかった. これに対し, リン酸マイクロセンサーは OH^- および HCO_3^- イオン濃度の増大に伴い EMF が低下した. HCO_3^- イオンに対する検量線の傾きは $-21 \text{ mV}/\log(\text{HCO}_3^-)$ であり, この値は HPO_4^{2-} イオンに対する検量線の傾き $-14 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ よりもむしろ急であった. この結果から, 開発したリン酸マイクロセンサーは, HPO_4^{2-} よりもむしろ HCO_3^- イオンや OH^- イオン (すなわち pH) に対する選択性が高いことが明らかとなった.

リン酸マイクロセンサーの T- PO_4 濃度の変化に対するレスポンスを検討した. リン酸マイクロセンサーを T- PO_4 濃度が $0.1 \mu\text{M}$ の溶液に浸し, EMF が定常に達するまで待った. その後あらかじめ用意した高濃度 T- PO_4 溶液 (stock solution) の適量を添加した. リン酸マイクロセンサーは stock solution の添加に伴い短時間で応答した. T- PO_4 濃度を $0.1 \mu\text{M}$ から $1.0 \mu\text{M}$ に変えたときの EMF の変化は非常に小さかったが, T- PO_4 濃度が $1.0 \mu\text{M}$ 以上の条件では十分に EMF が変化した. この結果から, 90% レスポンスタイムは 20s, ドリフトは約 $5 \text{ mV}/\text{h}$ であることが明らかとなった.

4. 結論: 本研究では, 新規の LIX 型リン酸マイクロセンサーを開発した. イオノフォアの異なる二種類の LIX を用いたセンサーについて性能を比較した結果, LIX-BU は選択性, 応答速度に優れていたが感度が悪かった. LIX-BE は pH および HCO_3^- イオンに加え Cl^- イオンを感知するという点で選択性は LIX-BU にやや劣っていたが, 検量線の傾きが理論値に近くなり, 検出範囲が広がった. 今後は, さらに選択性の高いイオノフォアを開発する.

謝辞: 本研究を遂行するにあたり CREST の支援を受けました. ここに記し謝意を表します.

参考文献

- 1) Lee et al. (2009) Sensors and Actuators B, 137, 121-128.
- 2) de Beer et al. (1997) Applied and Environmental Microbiology, 63, 973-977.
- 3) Gieseke and de Beer (2004) Molecular Microbial Ecology Manual, 1581-1612.
- 4) Sasaki et al. (2004) Talanta, 63, 131-134
- 5) Liu et al. (1997) Analytica Chimica Acta, 338, 209-214

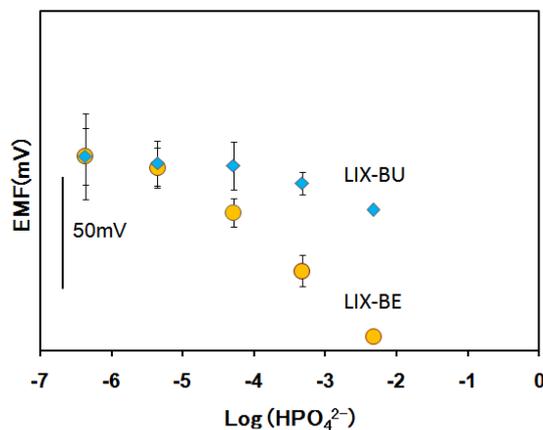


Figure 1 センサーの検量線

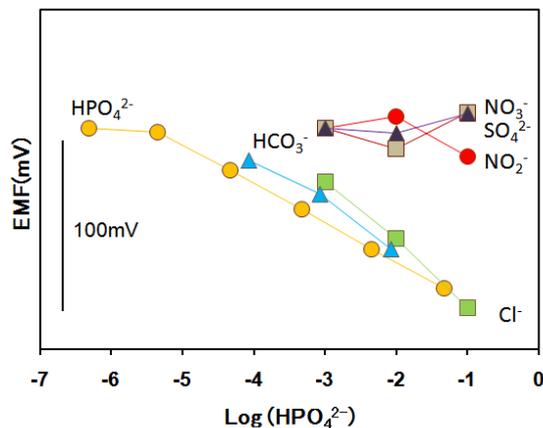


Figure 2 妨害イオンの影響

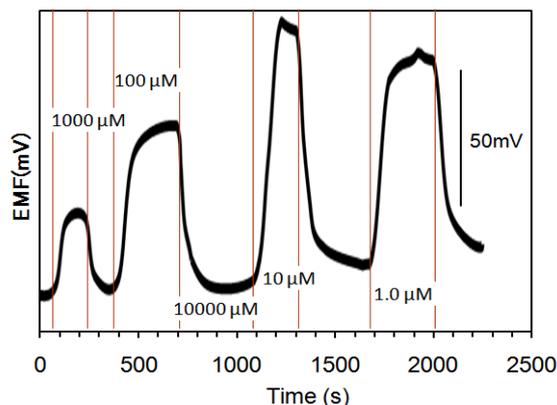


Figure 3 センサーのレスポンス