

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

Development of phosphate ion microsenors for application to environmental samples

北海道大学大学院工学院	○学生員	宮崎悠爾 (Yuji Miyazaki)
北海道大学大学院工学院		谷内翔 (Syo Taniuti)
北海道大学大学院工学研究院	正 員	押木守 (Mamoru Oshiki)
北海道大学大学院工学研究院	正 員	佐藤久 (Hisashi Satoh)
北海道大学大学院工学研究院	正 員	高橋正宏 (Masahiro Takahashi)
北海道大学大学院工学研究院	正 員	岡部聡 (Satoshi Okabe)

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30種類以上のマイクロセンサーが開発されており、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、 HCO_3^- 、 CH_4 、 CO_2 、有機酸、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 N_2O 、 NO 等のマイクロセンサーが使用されてきた¹⁻³⁾。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。リン酸は栄養塩の一つであり、生物学的処理プロセスでは生物の増殖に影響を及ぼす因子であり、その挙動を把握することは極めて重要である。リン酸は有機態リンの分解により生成され、一方で生物の摂取により消費される。従って、バイオフィーム内などのミクロな領域において濃度が時間的にも空間的にもダイナミックに変動していると考えられる。このようなミ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、コバルト線を直径10 μm 以下に調整した後にガラスでコーティングし、先端のみを露出させ、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）の濃度が 10^{-5} mol/Lから 10^{-1} mol/Lの範囲において検量線が直線となった。しかしながら、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 ）がセンシングナルを妨害した。DOやアルカリ度は環境サンプル測定の際に変動する可能性が高く、これら物質の妨害を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、Lee et al.が開発したコバルト線型リン酸マイクロ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を開発した。LIX型のセンサーは使用するイオノフォアによって大きく性能が変化する。本研究では複数のイオノフォアを用いてリン酸マイクロセンサーを作製した。

さらに、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、選択性、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 green glass と soda lime glass を用いて作製した^{2, 3)}。green glass をバーナーで熱して細くした後、green glass と soda lime glass をバーナーで熱して融解させ結合させた。green glass の先端を熱したニクロム線で溶解させながら引き、先端径を約 10 μm に調整した。150°Cのオーブンで 3 時間乾燥させた後、一晚シラン処理し、シラン溶液を除去するためにさらに数時間オーブンで乾燥させた。シリンジを用いて後部から内部液を注入した後に LIX を吸引した。さらに、パスツールピペットで製作したケーシングの後部から微小電極を挿入し、微小電極先端をケーシングから約 2 cm 突出させた状態で固定した。ケーシング内には 0.3 mol/L 塩化カリウム溶液を満し、遮へい電極として接地端子に接続した塩化銀被膜された銀線を挿入した。LIX は、o-nitro phenyl octyl ether ((株)同仁化学研究所)にイオノフォアとして tribenzyltin chloride (和光純薬工業株式会社) (3%(w/w))を用いた。以降はイオノフォアの名称から、この LIX を用いて作製したマイクロセンサーを BE-3 と称する。BE-3 の内部液は 0.01 mol/L の KH_2PO_4 溶液とした。検量線は T-PO_4 濃度を 0.1 $\mu\text{mol/L}$ から 10 mmol/L 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。

3. 結果および考察

Figure 1 に BE-3 の検量線を示す。検量線の傾きは-24.8 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 mV/log(HPO_4^{2-})) に近い値となった。 HPO_4^{2-} の検出範囲は 4.4 μM から 4.6 mM であった。Figure 2 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時間変化を示した。リン酸マイクロセンサーを

T-PO₄ 濃度が 0.1 μM の標準溶液に浸し、検出電圧 (EMF) が定常に達するまで待った。その後、Figure 2 に示した濃度の標準溶液にセンサーを浸し、センサーのレスポンスタイムを検討した。センサーは標準溶液の濃度の変化に対し瞬時に反応した。Figure 2 から、90%レスポンスタイムは 40 s であることが明らかとなった。ドリフトは約 2 mV/h であった。

次にリン酸マイクロセンサーの寿命を検討した。マイクロセンサー作製後、一定時間ごとに標準溶液を用いて測定を行い、検量線を作成した。未使用時は、センサーの先端を 10 mM のリン酸標準溶液に浸して保管した。その結果、最初の測定から 24 h 程度では検量線の傾きが大きく変わることはなかった。しかしながら、検量線の y 切片はドリフトのために変化した。このようにリン酸マイクロセンサーの寿命は他の LIX 型マイクロセンサーと同様に数日である事が明らかとなった。Milli-Q 水に各種イオン (NO₃⁻, NO₂⁻, HCO₃⁻, SO₄²⁻, Cl⁻) を 1 種類のみ添加し、段階的に濃度を変化させて各イオンの検量線を作成した (Figure 3)。センサーは 10 μM 以上の NO₃⁻, NO₂⁻ イオンに応答した。また、HCO₃⁻, SO₄²⁻, Cl⁻ イオンには 100 μM 以上の場合に応答した。測定結果から separate solution method (SSM) II により選択係数を算出した (Table 1)。LIX 型リン酸マイクロセンサーの選択性は比較的低く、センサーをサンプルに適用する際は、リン酸以外のイオンの濃度をできるだけ低くし、妨害イオンの影響を低減する必要がある事が明らかとなった。既往の研究から、リン酸マイクロセンサーは OH⁻ イオン、つまり pH の変化に影響を受けることがわかっている。そのため、測定の際は緩衝溶液を使用しサンプルの pH 変動をできるだけ少なくする事が望ましい。そこで、センサーに及ぼす緩衝溶液の影響を検討した。検討した緩衝溶液は Bis-tris、クエン酸、HEPES、酢酸の四種類である。濃度 100 μM の緩衝溶液を用いてリン酸標準溶液を作製し、検量線を作成した。その結果、Bis-tris、クエン酸を添加した場合は検量線の傾きは変化しなかったが、検出限界が 10 μmol/L 以上に上昇した。これに対し、HEPES および酢酸緩衝溶液で作成した検量線は、Milli-Q 水で作成した検量線と傾き、検出限界が同程度であった。これより、HEPES および酢酸の二種類の緩衝溶液はセンサーの性能に影響を与え

Table 1 各イオンに対するセンサーの選択係数
($\log(K_{ij}^{\text{pot}})$)

イオン	$\log K_{ij}^{\text{pot}}$	参考文献(4)
Cl ⁻	+1.5	-1.5
SO ₄ ²⁻	-2.8	-2.7
HCO ₃ ⁻	+1.2	-0.3
NO ₂ ⁻	+2.2	-1.3
NO ₃ ⁻	+1.7	-2.5

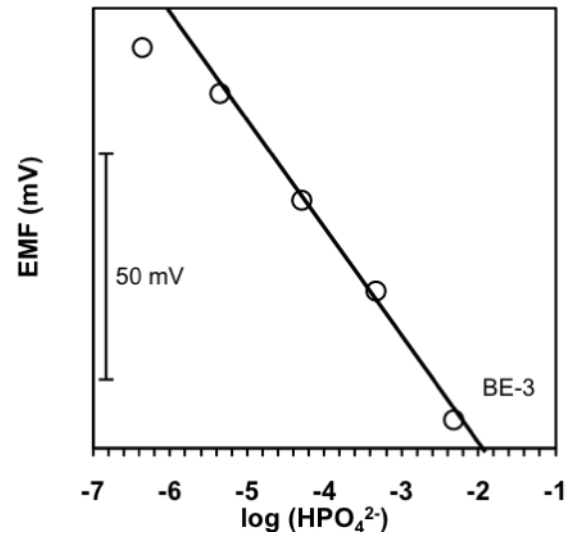


Figure 1 リン酸マイクロセンサー (BE-3) の検量線

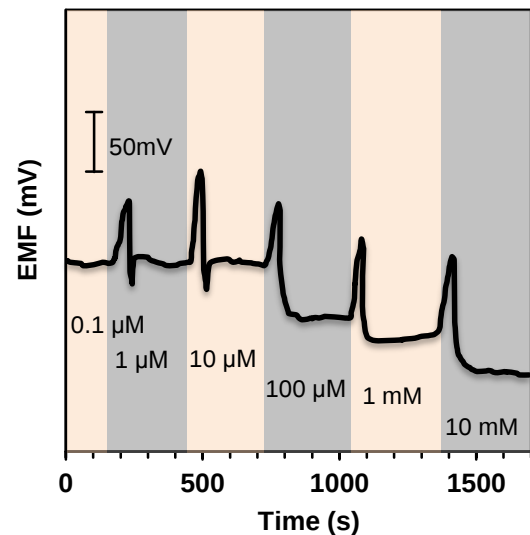


Figure 2 リン酸マイクロセンサーの T-PO₄ 濃度の変化に対するレスポンス

ないことがわかった。HEPES および酢酸緩衝溶液の作用範囲はそれぞれ pH=6.8~8.2, 3.4~5.9 である⁵⁾。このことを考慮し、測定条件に応じて二つの緩衝溶液を使い分ける必要がある。また、妨害イオンのうち、HCO₃⁻ 濃度は大気との交換、微生物反応により変動する。そこで、センサーにおよぼす HCO₃⁻ の影響をさらに検討した。Figure 4 に 1 mM の HCO₃⁻ を含むリン酸標準溶液の検量線と、リン酸のみの検量線を示した。この結果から、センサーの検量線は、HCO₃⁻ が 1 mM 以下であれば、HPO₄²⁻ が 5 μM 以上の範囲では著しい影響を受けないことが明らかとなった。これより、HPO₄²⁻ が 5 μM 以上存在すれば、HCO₃⁻ 濃度が変動してもセンサーは妨害を受けないことがわかった。Lee et al.が開発したコバルト線型リン酸センサーは DO の妨害を受けた¹⁾。これに対

し、本研究で開発した LIX 型センサーは、 T-PO_4 濃度が 1.0 mM の条件下では、DO が 0 から 8 mg/L まで変化しても EMF の差は 3 mV 以内であり、その測定原理から予想される通り、DO の妨害を全く受けなかった。

また、本研究では、根圏サンプルとしてゲランガム培地で培養したシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の測定を予定している。培養はムラシゲ・スクーグ培地で行なっている。培地には様々な妨害イオンが含まれている。そのため、培地の組成を模した標準溶液を用いてリン酸マイクロセンサーの検量線を作成した。標準溶液中の主要な妨害イオン濃度は、 NO_3^- 、 Cl^- が 200 μM 、 SO_4^{2-} が 330 μM であった。妨害イオンの影響により検量線の傾きが $-46.8 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ から $-40.3 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ に低下したものの、検出限界は変化しなかった (Figure 5)。これより、開発したマイクロセンサーは標準溶液を用いて培養した根圏サンプルに適用可能である事が明らかになった。

4. 結論

本研究では、tribenzyltin chloride をイオノフォアに用いた LIX 型リン酸マイクロセンサーを作製した。センサーの傾きは $-24.8 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ であった。センサーは OH^- 、 HCO_3^- 、 Cl^- の妨害を受けた。 HCO_3^- は 1 mM 以下であればセンサーを妨害しなかった。センサーは根圏サンプルに適用可能である事が明らかになった。

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) 澤田, 大森: 緩衝液 その原理と選び方・作り方, p95-103 講談社.

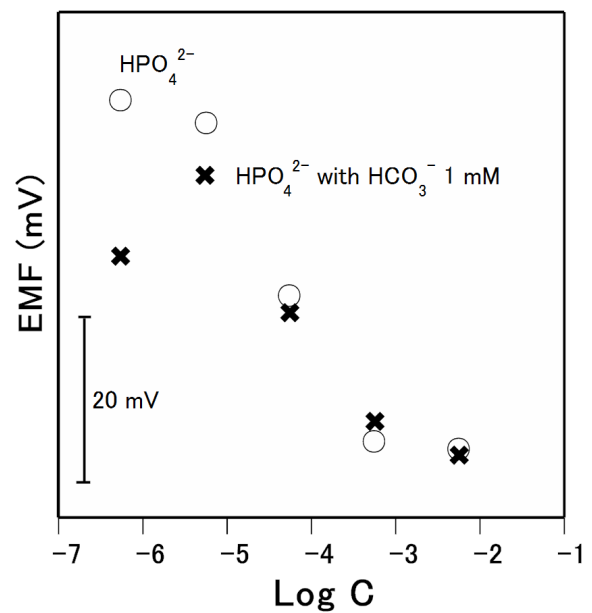


Figure 4 リン酸マイクロセンサーの炭酸イオン共存下の検量線

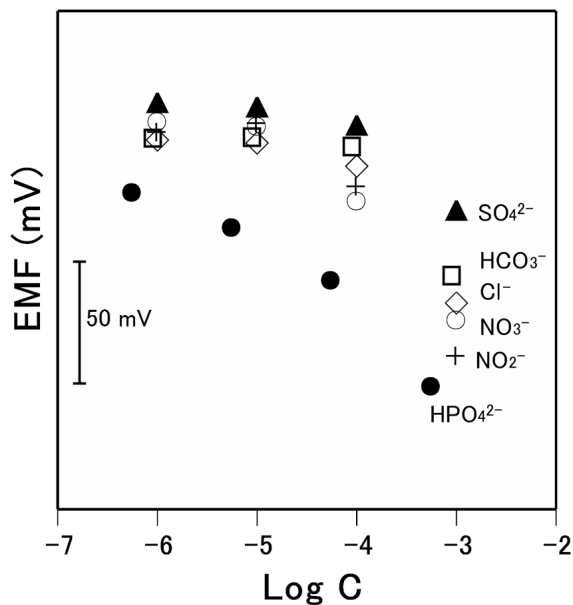


Figure 3 リン酸マイクロセンサーの様々なイオンに対する検量線

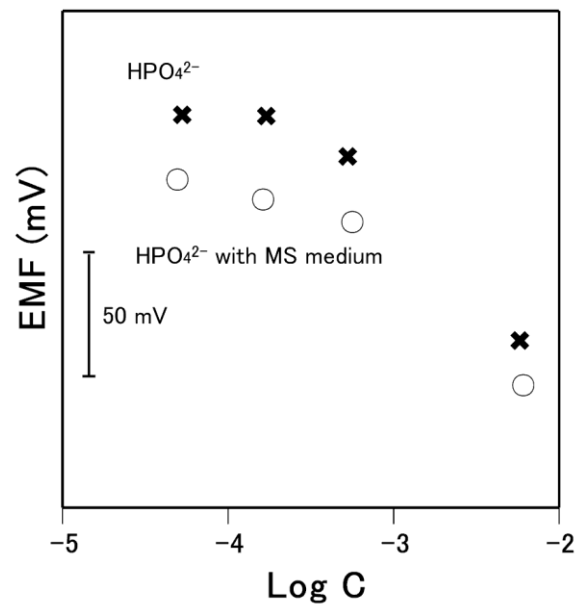


Figure 5 ムラシゲ・スクーグ培地組成を用いた標準溶液中での検量線