

N-2 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

○宮崎 悠爾¹・押木 守¹・佐藤 久^{1*}・高橋 正宏¹・岡部 聡¹

¹北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門 (〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西3丁目)

* E-mail: qsatoh@eng.hokudai.ac.jp

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きた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、 HCO_3^- 、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 N_2O 、 NO 等のマイクロセンサーが開発され使用されてきた。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マイクロ領域において濃度が時間的にも空間的にも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.¹⁾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。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)が妨害物質となった。DOやアルカリ度は環境サンプルの測定時に変動する可能性が高く、これら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、Lee et al.が開発した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。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。110°Cのオーブンで数時間乾燥させた後、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LIXを吸引した³⁾。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 M塩化カリウム溶液を満たし、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にはo-nitrophenyl octyl ether((株)同仁化学研究所)に、2%(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)を添加したものを用いた。検量線は T-PO_4 濃度を0.1 μM ~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。

3. 結果および考察

Figure 1 にリン酸マイクロセンサーの検量線の一例を示した。センサーは HPO_4^{2-} 濃度が1.8 $\mu\text{mol/L}$ から10 mmol/Lの範囲で直線となった($r^2=0.999$)。検量線の傾きは $-28.2 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ であった。3本のセンサーについて合計6回検量線を作成したところ、検量線の傾きは $-6 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ から $-30 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ の範囲内にあり、平均値は $-15 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ であった。全ての傾きがネルンストの式から求められる理論値($-29 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$)よりも高かった。本研究室では約15年に渡り様々なLIX型イオンセンサー(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小さい傾向がある。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。

既往の研究においてリン酸‘マクロ’センサーは HPO_4^{2-} イオンまたは H_2PO_4^- イオンを主に検出した。そこ

で、本研究で作成したセンサーがどちらのイオン種を検出しているのかを検討した。Figure 2 に T-PO₄ 濃度が一定の条件下で pH を変化させた場合のセンサーの検出値 (Electromotive force; EMF) を示した。T-PO₄ を構成する 4 種のリン酸化学種は、各解離反応の解離定数に従い、pH に対応して存在割合が変化する。Figure 2 には、センサーが HPO₄²⁻ イオンのみ、または H₂PO₄⁻ イオンのみを検出した場合に得られる検量線も併せて示した。この結果から明らかなように、本研究で作製したセンサーは pH が 7 以下の条件下においては主に HPO₄²⁻ イオンを検出していることが明らかとなった。pH が 7 以上の条件下では HPO₄²⁻ イオン濃度は変化していないにもかかわらず、センサーの EMF は変化した。これは、センサーが OH⁻ 濃度の増大を HPO₄²⁻ イオン濃度の増大として検出していることが考えられた。

そこで、リン酸マイクロセンサーに及ぼす妨害イオンの影響を検討した (Figure 3)。Milli-Q 水に妨害イオンの可能性のあるイオンを 1 種類のみ添加した。イオンの濃度範囲は 10⁻⁶ M から 10⁻² M とした。10⁻³ M 以下の濃度範囲では、リン酸マイクロセンサーは Cl⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, SO₄²⁻ イオンに反応しなかった。これに対し、リン酸マイクロセンサーは OH⁻ および HCO₃⁻ イオン濃度の増大に伴い EMF が低下した。HCO₃⁻ イオンに対する検量線の傾きは -21 mV/log(HCO₃⁻) であり、この値は HPO₄²⁻ イオンに対する検量線の傾き -14 mV/log(HPO₄²⁻) よりもむしろ高かった。この結果から、開発したリン酸マイクロセンサーは、HPO₄²⁻ よりもむしろ HCO₃⁻ 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。そこで separate solution method (SSM) II により各イオンの選択係数を算出した (Table 1)。センサーの選択性は OH⁻, HCO₃⁻, HPO₄²⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, Cl⁻, SO₄²⁻ の順に低下した。今後、リン酸マイクロセンサーの HPO₄²⁻ イオンに対する選択性を高めるために、LIX に用いる添加剤の濃度を最適化する。さらにはイオノフォアを変更することを検討する。

Figure 4 に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を示した。リン酸マイクロセンサーを T-PO₄ 濃度 = 0.1 μmol/L の溶液に浸し、EMF が定常

に達するまで待った。あらかじめ用意した高濃度 T-PO₄ 溶液 (stock solution) の適量を、T-PO₄ 濃度が Figure 4 に示した濃度になるように添加した。Figure 4 に示したように、リン酸マイクロセンサーは stock solution の添加に伴い瞬時に反応した。T-PO₄ 濃度を 0.1 μmol/L から 1.0 μmol/L に変えたときの EMF の変化は非常に小さかったが、T-PO₄ 濃度が 1.0 μmol/L 以上の条件下では十分に EMF が変化した。Figure 4 から、90% レスポンスタイムは 20 s、ドリフトは約 5 mV/h であることが明らかとなった。

長期間の安定性を検討するため、作製直後と作製から 2 日後のセンサーの性能を評価した。検量線の傾きの差は 1 mV 以内であった。しかしながら、作製直後か

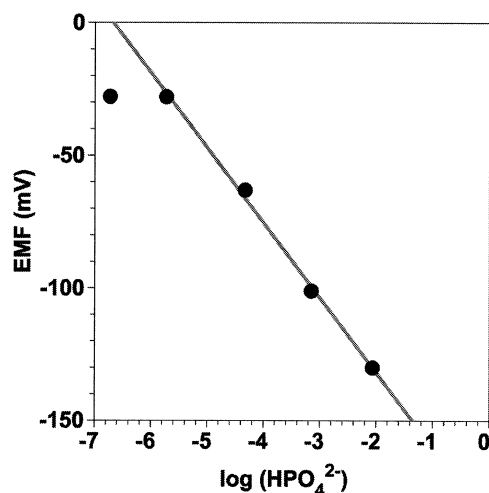


Figure 1 リン酸マイクロセンサーの検量線。

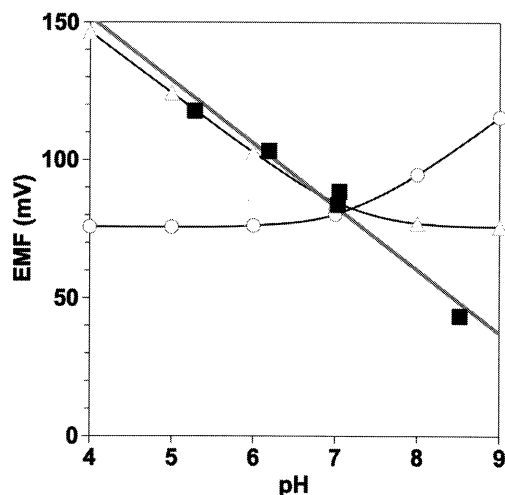


Figure 2 T-PO₄ 濃度が一定の溶液に対するセンサーの EMF への pH の影響。(■) センサーの検量線。(Δ) センサーが HPO₄²⁻ イオンのみを検出した場合に理論的に得られる検量線。(○) センサーが H₂PO₄⁻ イオンのみを検出した場合に理論的に得られる検量線。

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

イオン	$\log K_{ij}^{pot}$	参考文献(4)
OH ⁻	+4.9	
Cl ⁻	-4.0	-1.5
SO ₄ ²⁻	-4.7	-2.7
HCO ₃ ⁻	+1.7	-0.3
NO ₂ ⁻	-1.1	-1.3
NO ₃ ⁻	-3.5	-2.5

ら連続して使用したリン酸マイクロセンサーのうち、5 時間後に全くレスポンスが見られなくなったセンサーもあった。本研究室で作製しているイオンセンサー(NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 等)は少なくとも作製から 3 日間は安定しており、リン酸マイクロセンサーは他のマイクロセンサーとは異なる挙動を示した。リン酸マイクロセンサーの長期安定性の向上は今後の課題である。

その他のリン酸マイクロセンサーの性能についても解析した。De Beer et al.²⁾は NO_2^- マイクロセンサーを開発した。 NO_2^- マイクロセンサーのイオノフォアには Co(III) が含まれているため、サンプルに硫化水素(H_2S)が含まれる場合、 H_2S が Co(III) を還元してしまい、 NO_2^- マイクロセンサーは不可逆的に阻害されることを明らかにした。リン酸マイクロセンサーのイオノフォアには Sn が含まれているため、 H_2S のリン酸マイクロセンサーに及ぼす影響を検討した。 H_2S 濃度を $0.4 \mu\text{mol/L}$ から 1 桁ずつ $400 \mu\text{mol/L}$ まで増大させた溶液を準備し、これらにリン酸マイクロセンサーを 10 min 浸した。浸す前後の検量線を比較したところ、検量線の傾きは $-35 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ から $-30 \text{ mV}/\log(\text{HPO}_4^{2-})$ の範囲から外れることは無かった。検量線の y 切片は変化したが、これは H_2S の影響ではなく、センサーのドリフトによるものである。以上のことから、 H_2S のリン酸マイクロセンサーへの影響はさほど大きくないことが明らかになった。リン酸マイクロセンサーの適用サンプルとして、嫌気環境下のバイオフィルムや底泥が考えられる。これらのサンプル内には H_2S が蓄積している場合があるが、このようなサンプルにもリン酸マイクロセンサーは適用可能であることが示された。

Lee et al.¹⁾が開発したセンサーは DO が妨害物質であった。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 mmol/L の溶液の DO が 0 mg/L の条件と 8 mg/L の条件において、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 に対して全く妨害されなかった。

リン酸マイクロセンサーを溶液中に固定したサンプル内の濃度測定に用いる場合、水中とサンプル中では著しく流速が異なることが容易に推察される。そこで、センサーに対する流速の影響を解析した。検量線を攪拌をしない標準溶液と、 200 rpm で攪拌した標準溶液で作製した。EMF の差は 5 mV 以内であった。攪拌によりレスポンスタイムは短縮された。これは、センサーへのリン酸の輸送が促進されたためである。

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。センサーの検量線は HPO_4^{2-} 濃度が $1.8 \mu\text{mol/L}$ から 10 mmol/L の範囲で直線となった。センサーは OH^- イオン(すなわち pH)および HCO_3^- イオンの妨害を受けた。90%レスポンスタイムは 20s、ドリフトは約

5 mV/h であった。センサーの寿命は数時間から数日であった。DO および H_2S 、流速の影響はほとんど見られなかった。今後は LIX に用いる添加剤の最適化、イオノフォアの変更により、センサーの性能を向上させる。

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.

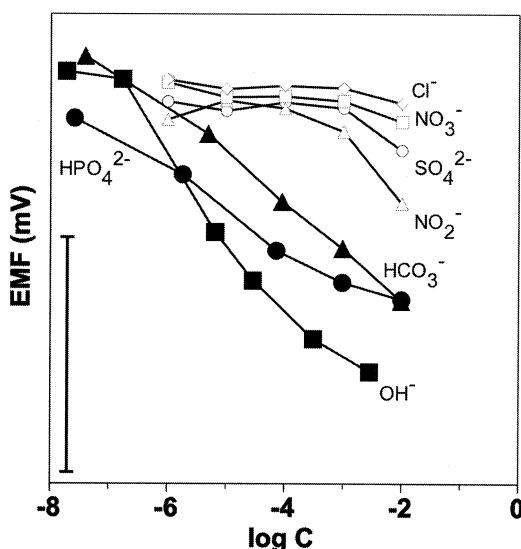


Figure 3 リン酸マイクロセンサーの様々なイオンに対する検量線。

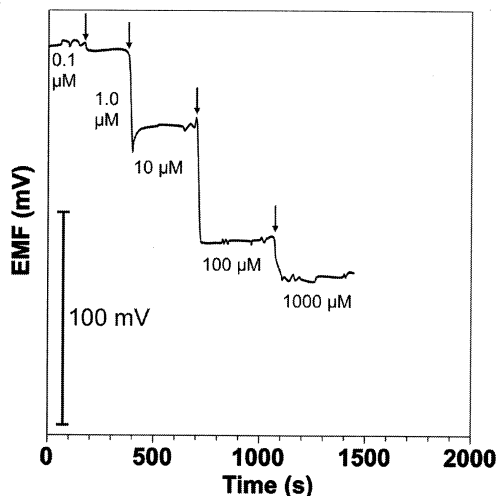


Figure 4 リン酸マイクロセンサーの T-PO_4 濃度の変化に対するレスポンス。矢印は stock solution を添加した時間を示す。