

イオン濃度を電極で測りたい

I はじめに ¹⁻¹²⁾

試料中の電解質、特に金属イオンの濃度を分析する方法には、沈澱試薬を用いる重量法、キレート試薬や比色試薬を用いる滴定法や比色法、金属イオンの蛍光を利用する蛍光分析法および電極法などがある。イオン選択性電極 (Ion Selective Electrode, ISE) を用いた電極法は、水溶液中の金属イオン濃度を簡便に測定することができるため、現在、多くの分野で利用されている測定法のひとつである。その中で、液膜型のイオン選択性電極は、特定のイオンと選択的に相互作用することができるイオノフォアを担持した膜(電極膜)をもち、測定するイオンに応じて電極膜に添加するイオノフォアを変えることにより、種々のイオンを分析対象とすることができる。また、参照電極とともに試料液に浸すだけで、試料中のイオンを定量でき、しかも自動化、微小化が可能なことから、イオン電極を組み込んだ多種イオン自動分析装置も開発されている。電極膜は、膜支持剤としてポリ塩化ビニル (PVC) を使用するのが一般的であり、この PVC 膜の中にイオノフォア、膜溶媒、アニオン排除剤を混在させる。液膜型電極のイオン選択性はイオノフォアによるところが大きいが、これら電極膜の構成成分の組み合わせや配合比によっても変化するので、電極膜を作製する際に検討する必要がある。

クラウンエーテルは代表的なニュートラルキャリアーである。クラウン環の空孔径に合った大きさの金属イオンを選択的に認識するため、イオン選択性電極のイオノフォアとして汎用されている。一般にリチウムイオンに対しては 14-crown-4、ナトリウムイオンに対しては 15-crown-5、カリウムイオンに対しては 18-crown-6 が適している。しかしながら金属イオンを 2 つのクラウン化合物でサンドイッチすることで形成する、1:2 錯体の方が安定である場合が多い。Bis(12-crown-4) や Bis(benzo-15-crown-5) のようなビスクラウンエーテルは、二つのクラウン環で金属イオンをはさみ込むことで、モノクラウンエーテルよりも金属イオンに対する選択性を向上させることができる。ビスクラウンエーテルによる金属イオンの捕捉には、ナトリウムイオンに対して 12-crown-4、カリウムイオンに対して 15-crown-5 が適している。一方リチウムイオンに関しては、ビスクラウンエーテルよりも、むしろ 1:1 錯体のみが形成されるようにかさ高い基を導入し、選択性を向上させている。また、酸素、窒素、硫黄などのクラウン環のヘテロ原子の種類、数およびその配置も錯形成反応に大きく関与している。一般に、酸素原子を含むニュートラルキャリアーはアルカリ、アルカリ土類金属イオンに優れた選択性を示し、窒素や硫黄原子を含むニュートラルキャリアーは重金属や遷移金属イオンを対象とするイオンセンサーに使用できる。

生体内でのアルカリ金属イオン濃度や微量金属イオン濃度の変化が様々な病態を反映することから、生体内イオン濃度の迅速な測定は診断や治療を行う上で大きな意義があり、自動化が可能な液膜型イオン選択性電極による方法は、緊急検査などに適した測定法といえよう。

(イオノフォア)

- 1) カリウムイオノフォア
Bis(benzo-15-crown-5)(Code: B020) ^{14, 16, 19, 21)}
- 2) ナトリウムイオノフォア
Bis(12-crown-4)(Code: B021) ^{14, 15, 19)}
- 3) カルシウムイオノフォア
HDOPP-Ca(Code: H003)
- 4) リチウムイオノフォア
Dibenzyl-14-crown-4(Code: D043) ^{30, 31)}
TTD-14-crown-4(Code: T302)
- 5) アンモニウムイオノフォア
TD19C6 (Code: T402)
- 6) 塩化物イオン用イオノフォア
Bisthiourea-1(Code: B432)
- 7) マグネシウムイオノフォア
C14-K22B5 (Code: C391)
K22B1B5 (Code: K226)
K22B9 (Code: K225)

(可塑剤)

- DOPP(Code: D016)
- NPOE(Code: N015)

(アニオン排除剤)

- Kalibor[®] (Na-TPB)(Code: K003)
- TFPB(Code: T037)

II PVC 膜型イオン電極の作成方法 ¹⁷⁾

Bis(12-crown-4) を用いたナトリウムイオン電極の作製方法について以下に述べる。

1. 試薬

- Bis(12-crown-4)
- NPOE
- K-TCPB
- PVC (平均重合度 1100)
- THF

2. 方法

- 1) Bis(12-crown-4): 10 mg(3.1 wt%), NPOE: 200 mg, PVC(平均重合度 1,100): 101 mg を THF 3 ml に溶解する^{*1}。
- 2) 内径 34 mm のフラットペトリ皿に流し込み水平な場所で一晚風乾する。
- 3) 得られた PVC 膜から電極先端の大きさに応じて円盤状(一般に 5~7 mm 径)の膜を切り取る。
- 4) 得られた電極膜を THF を用いて電極に取り付けよく乾かす。
- 5) 内部液を注入した後、電極の先端を内部液と同じ水溶液に 1~2 時間浸漬してコンディショニングを行う^{*2}。

3. 注意事項

- ※ 1 電極膜の組成はイオン電極の選択性に大きく影響するので、イオノフォアや膜溶媒、アニオン排除剤の混合比を検討することが望ましい。
- ※ 2 他のイオン電極を作成する場合は、内部液に測定対象イオンの水溶液を用いること。

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

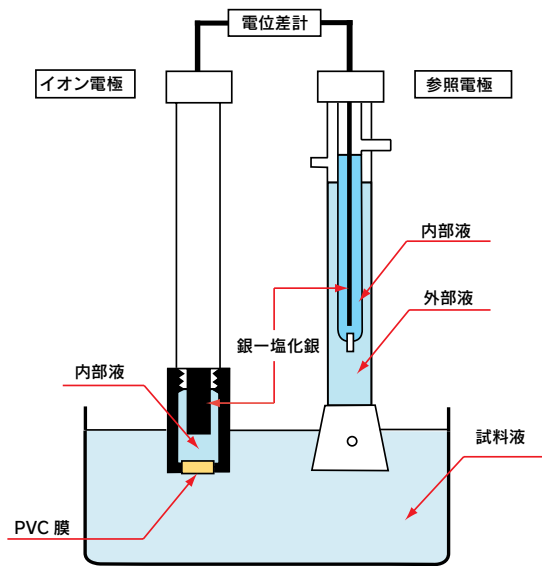


図1 イオン選択性電極概図

III 未知試料濃度の測定法^{1, 10, 12)}

イオン電極を使った生体試料中の金属イオン濃度の一般的な測定方法を以下に示す。未知試料濃度の測定法には、検量線法と標準添加法がある。検量線法は試料液と標準液のバックグラウンド組成がほぼ等しい時に有効であるが、組成が大きく異なり添加剤を加えても条件を規制することが困難な場合は、標準添加法が有効である。ここでは標準添加法を利用した Gran's plots 法の場合について述べる。

1. 試薬

- 蒸留水または緩衝液
- 飽和塩化カリウム溶液
- 測定対象イオンの水溶液

2. 方法

- 1) 生体試料 (血清、尿) を蒸留水や緩衝液で適当な濃度に希釈し、試料液とする。
- 2) 測定するイオン種によりイオノフォアを選択し、前述した [II PVC膜型イオン電極の作成方法] に従ってイオン電極を作製する。
- 3) 参照電極として銀-塩化銀のダブルジャンクション型電極を用意する。
- 4) 参照電極の内部液に飽和塩化カリウム溶液、外部液にはイオン電極に妨害を与えない溶液を注入する。
- 5) イオン電極、参照電極をイオンメーターに接続する。
- 6) 先の試料液を一定量正確に測り取る。
- 7) イオン電極と参照電極を試料液に浸して攪拌し電位が安定したことを確認する。
- 8) 試料液の約 1/10 の量で、予想される約 10 倍の濃度の添加液 (測定対象イオンの水溶液) を正確に測り取り 7) に添加する。
- 9) 電位が安定したことを確認し、その時の電位を読みとる。
- 10) 3 分程度蒸留水に電極を浸し電極のメモリー効果を取り除いた後、9) の溶液に再び 8) と同量の添加液を添加し電位を読みとる。
- 11) 10) の操作を再度行い、合計 3 点の電位をもとに Gran's plots 法を用いて未知試料濃度を求める。横軸に添加液量、縦軸に $(V_0 + V^*)10^{E/S}$ をとり、3 つの測定電位をプロットする時に得られる直線が横軸と交わる点を V_T^* とする。この時の試料液中の活量変化と濃度の変化はほぼ等しいとすると以下の式が成

立する。これより未知試料濃度 (C_0) を求める。

$$C_0 = -V_T^* \cdot C^* / V_0$$

C_0 : 試料液の濃度、 V_0 : 試料液の液量、 C^* : 添加液の濃度、 V^* : 添加液の液量、 E : 測定電位、 S : ネルンスト応答する時のスロープ。(1 価のイオンは 60、2 価のイオンは 30 に近似する。)

3. 注意事項

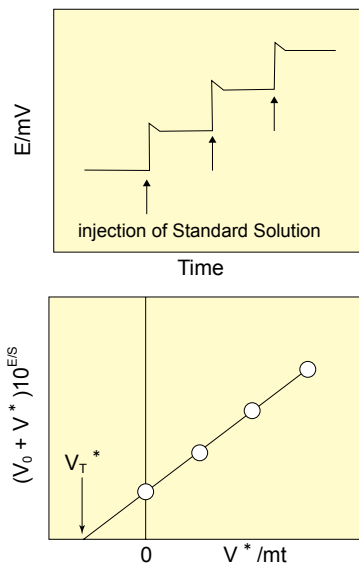
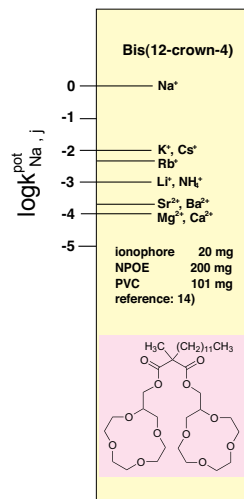


図2 標準添加法に Gran's Plots 法を利用した例

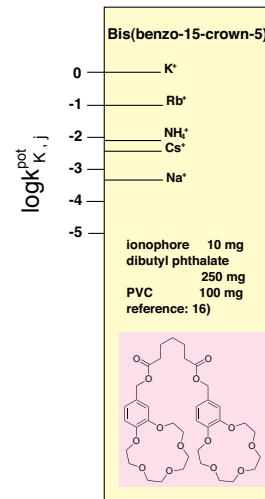
生体試料である血清や尿などを測定対象とする場合は、蒸留水や緩衝液で希釈して下さい。Tamura らは血清あるいは尿中のナトリウムイオンやカリウムイオン濃度を測定する際に、蒸留水で 10 倍に希釈した試料液を用いるとよいと報告されております¹⁸⁾。また血清中のリチウムイオンを定量する場合、Kimura らは限外濾過膜を通して除蛋白した試料液を使用しています³⁰⁾。P. Anker らは血清中の総カルシウムイオン濃度を測定する場合に、血清中のタンパク質やシュウ酸と結合したカルシウムを解離させるために、酢酸緩衝液 (0.382 mol/l 酢酸、0.02 mol/l NaOH) を加え、試料液の pH を 4 以下にしてフリーのカルシウムイオン濃度を測定しています¹³⁾。

IV イオノフォア別選択係数と膜組成

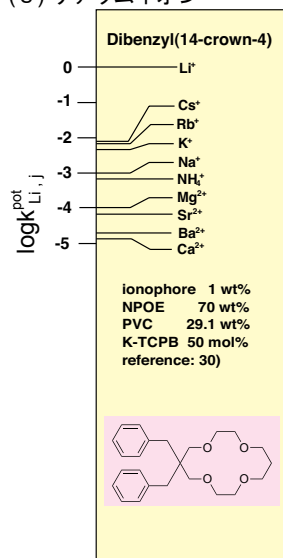
(1) ナトリウムイオン



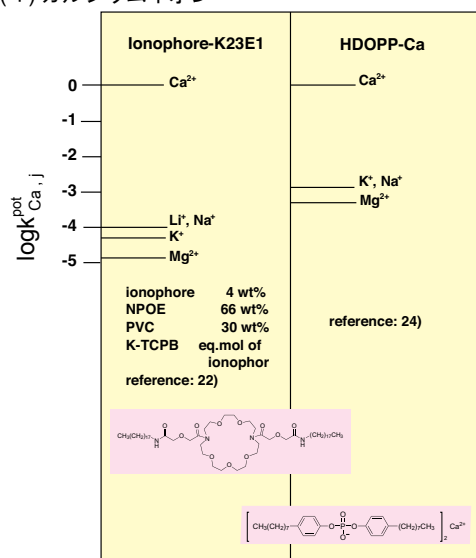
(2) カリウムイオン



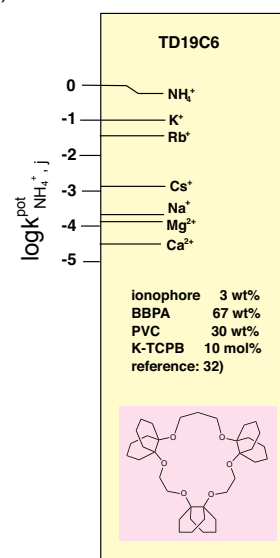
(3) リチウムイオン



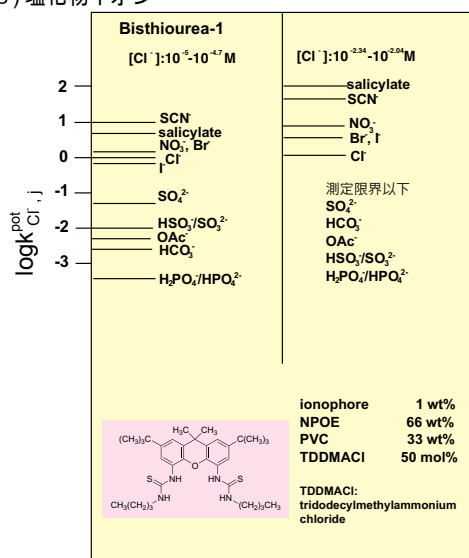
(4) カルシウムイオン



(5) アンモニウムイオン



(6) 塩化物イオン



参考文献

- 日本分析化学会編"第4版実験化学講座 27 生物有機", 丸善株式会社, **1991**, 225.
- 今任稔彦, "高分子膜型イオン電極の開発と流れ系分析への応用", ぶんせき, **1989**, 9, 758.
- 木村恵一, 庄野利之, "イオノフォアを利用する分析化学", ぶんせき, **1982**, 11, 803.
- 勝 孝, "イオン選択性電極と臨床化学分析", ファルマシア, **1995**, 31(2), 175.
- 勝 孝, "イオン選択性電極の開発と応用", Dojin News, **1994**, 71, 3.
- 長谷川佑子, 関根達也, クラウンエーテル類の分析化学への利用, ぶんせき, **1982**, 3, 155.
- 坂岸良克, "臨床化学分析-無機成分", ぶんせき, **1985**, 9, 618.
- 阪本英文, "Li⁺ 選択性 14-クラウン-4 誘導体の開発と Li⁺ センシングへの応用", ぶんせき, **1992**, 6, 468.
- 喜納兼勇, "リチウムイオノフォアの開発と応用", ぶんせき, **1987**, 9, 642.
- 石橋信彦, 城 昭典, "イオン電極の使い方", ぶんせき, **1978**, 4, 210.
- 小田嶋和徳, "超分子の形成によって発生する電気化学的シグナル-化学センサーへの応用と人工イオンチャンネルの可能性-", 現代化学, **1995**, 296, 38.
- 八木謙一, 西沢精一, "イオンセンサーをつくる", 現代化学, **1994**, 277, 51.
- P. Anker, E. Wieland, D. Ammann, R. E. Dohner, R. Asper, W. Simon, "Neutral Carrier Based Ion-Selective Electrode of the Determination of Total Calcium in Blood Serum", *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 1970.
- H. Tamura, K. Kimura, T. Shono, "Coated Wire Sodium- and Potassium-Selective Electrodes Based on Bis(crown ether) Compounds", *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 1224.
- T. Manuzumi, D. Wegmann, G. Suter, D. Ammann, W. Simon, "Neutral Carrier-Based Na⁺-Selective Electrode for Application in Blood Serum",

- Mikrochim. Acta* [Wien], **1986**, 1, 331.
- K. Kimura, T. Maeda, H. Tamura, T. Shono, "Potassium-selective PVC membrane electrodes based on bis- and poly(crown ether)s", *J. Electroanal. Chem.*, **1979**, 95, 91.
- H. Tamura, K. Kumami, K. Kimura, T. Shono, "Simultaneous Determination of Sodium and Potassium in Human Urine or Serum Using Coated-Wire Ion-Selective Electrodes Based on Bis(Crown Ether) s", *Mikrochim. Acta* [Wien], **1983**, 11, 287.
- K. Kimura, H. Tamura, T. Shono, "A Highly Selective Ionophore for Potassium Ions: a Lipophilic Bis(15-crown-5) Derivative", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1983**, 492.
- 田村 裕, 木村恵一, 庄野利之, 日本分析化学会第 42 回分析化学討論会講演要旨集, **1981**, 1E14.
- K. Kimura, A. Ishikawa, H. Tamura, T. Shono, "Lipophilic Bis(crown ether) Derivatives of 15-Crown-5 and 18-Crown-6 as Neutral Carriers of Ion-selective Electrodes", *J. Chim. Soc. Perkin Trans. II*, **1984**, 447.
- H. Tamura, K. Kimura, T. Shono, "Effect of Plasticizer on the Selectivity of Potassium-selective PVC Membrane Electrodes Based on Bis(crown ether)s", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1980**, 53, 547.
- 佐藤さやか, 松本行弘, 渡辺一彦, 鈴木孝治, 日化第 65 春季年会講演要旨集, **1993**, 2A211.
- B. J. Birch, A. Craggs, G. J. Moody, J. D. R. Thomas, "Detection limits of calcium ion-selective electrodes in relation to ligand-containing systems in Pungor, E. (Editor), Ion-selective Electrodes, Akademiai Kiado", *Budapest and Elsevier, Amsterdam*, **1973**, 335.
- J. D. R. Thomas, "Design of calcium ion-selective electrodes", *Lab. Pract.*, **1978**, 27, 857.
- L. Keil, G. J. Moody, D. R. Thomas, "An evaluation of PVC matrix membrane calcium-selective electrodes based on nitrated(octylphenyl)phosphate sensors and phosphonate mediators", *Anal. Chim. Acta*, **1978**, 96, 171.
- G. J. Moody, N. S. Nassory, J. D. R. Thomas, "Calcium Ion Selective Electrodes Based on Calcium Bis[di(p-1,1,3,3-tetramethylbutylphenyl)-phosphate] Sensor and Trialkyl Phosphate Mediators", *Analyst*, **1978**, 103, 68.
- A. Craggs, G. J. Moody, J. D. R. Thomas, "PVC Matrix Membrane Ion-Selective Electrodes", *J. Chem. Educ.*, **1974**, 51, 541.
- J. Ruzicka, E. H. Hansen, J. C. Tjell, "Selectrode-the universal ion-selective electrode. Part VI. The calcium(II) selectrode employind a new ion exchanger in a nonporous membrane and a solid-state reference system", *Anal. Chim. Acta*, **1973**, 67, 155.
- N. Nishino, T. Kamizuru, Y. Sano, T. Nakashima, H. Karakawa, T. Fujimoto, "Calcium ionophorous activity of cyclic hexapeptides with finely regulated conformation", *Pept. Chem.*, **1989**, 365.
- K. Kimura, H. Oishi, T. Miura, T. Shono, "Lithium Ion Selective Electrodes Based on Crown Ethers for Serum Lithium Assay", *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 2331.
- K. Kimura, H. Yano, S. Kitazawa, T. Shono, "Synthesis and Selectivity for lithium of Lipophilic 14-crown-4 Derivatives bearing Bulky Substituents or an Additional Binding Site in the Side Arm", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1986**, 1945.
- K. Suzuki, D. Siswanta, T. Otsuka, T. Amano, T. Ikeda, H. Hisamoto, R. Yoshihara and S. Ohba, "Design and Synthesis of a More Highly Selective Ammonium Ionophore Than Nonactin and Its Application as an Ion-Sensing Component for an Ion -Selective Electrode", *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 2200.