

## F I A において固定化試薬を用いた 化学種の光学的計測

九州大学工学部 川畑祐司

1. 従来の F I A 法においては、その検出器にイオン電極や吸光・蛍光光度計を用いることが多い。なかでも、吸光・蛍光光度計を用いる光学的な計測法では、高感度で高選択的な呈色・蛍光試薬を用いることにより、わずかな試料量を前処理することなく測定することができる。一方、近年、これら試薬を担体に固定化し、試薬を消費することなく、連続的に分析を行う方法も研究されている。本稿では、このような固定化試薬を用いて、種々の化学種を光学的に計測する方法について概説する。

### 2. 陽イオンの計測

#### 2.1 pH の測定

現在、数多くの pH 指示薬が有用であり、これら指示薬を固定化したフローセルによる pH 測定法も多数報告されている。まず、Kirkbrightらはスチレン-ジビニルベンゼン共重合体からなる高分子樹脂にプロモチモールブルーなどの pH 指示薬を固定化し、これをフローセルに充填して、連続的な pH 測定を行っている<sup>1)</sup>。フローセルの構造を Fig. 1 に示す。pH 指示薬はメタノール中で高分子樹脂と攪拌するだけで固定化できる。また、光ファイバーを通して樹脂層からの光源の反射光強度を

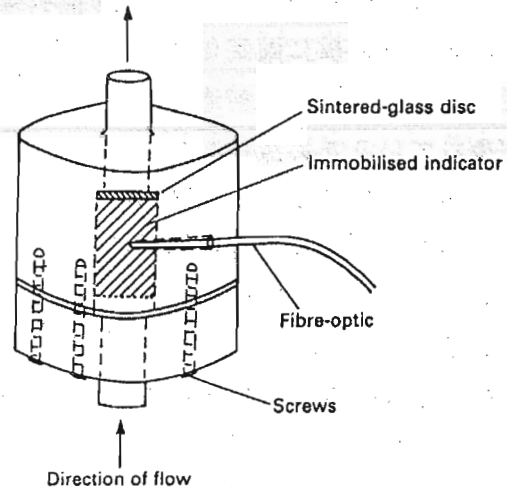


Fig. 1 Flow cell with immobilized pH indicator<sup>1)</sup>

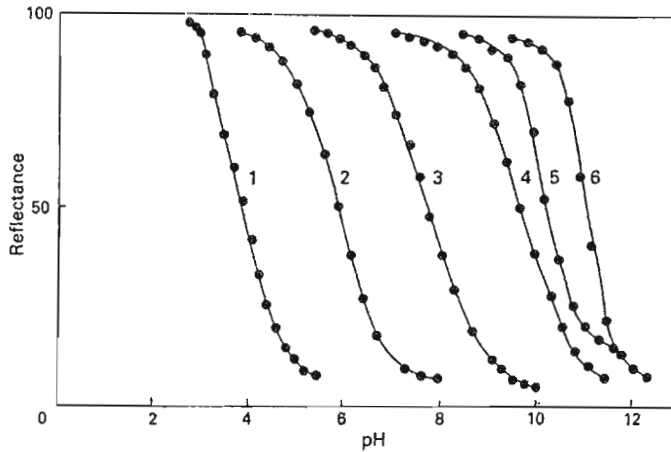


Fig. 2 Reflectance signal as function of pH for immobilized (1) bromophenol blue, (2) bromocresol purple, (3) bromothymol blue, (4) thymol blue, (5) phenolphthalein, and (6) thymolphthalein<sup>1)</sup>

測定することにより、指示薬の吸光度変化をモニターしている。Fig. 2に示すように、酸解離定数が異なる6種類のpH指示薬を用いることにより、pH3~12と広いpH域に対して適用できるように工夫されている。また、Jonesらは多孔性セルロース膜にpH指示薬であるコンゴレッドを固定化し、これをフローセル内に取り付けて、広いpH応答域(4 pH 単位以上)と迅速な応答(1.3秒以下)を有する検出器を開発している<sup>2)</sup>。一方、蛍光性pH指示薬を固定化したフローセルも開発されている。Offenbacherらは、蛍光性pH指示薬であるヒドロキシピレンやヒドロキシクマリンをガラス板に固定化し、これをフローセル内に取り付けて、連続的なpH測定を行っている<sup>3, 4)</sup>。前述の吸光法に基づくpH測定法と比較すると、蛍光法の感度が優れているため微小なフローセルを作製できること、試料溶液のわずかな光吸収が大きな妨害とならないことなどが特徴として挙げられる。

このような固定化pH指示薬をFIA法に用いて、その有用性を示したのは、Woodsらとである<sup>5, 6)</sup>。彼らは、試料のイオン強度が低い場合、ガラス電極が適用困難な雨

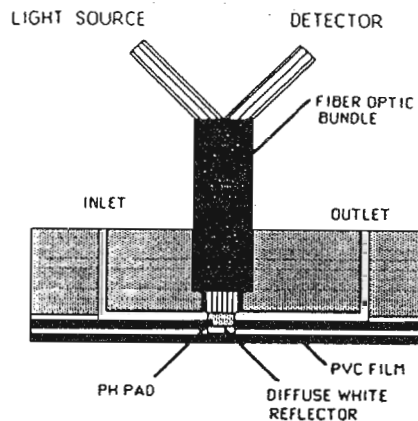


Fig. 3 Construction of flow cell<sup>5)</sup>

水や河川水などについて、光学的な pH測定を行っている。彼らの開発したフローセルの構造をFig. 3に示す。流路に市販のpH試験紙(pH PAD)を設け、光ファイバーを通して反射光強度より吸光度変化をモニターしている。Fig. 4に示すように、pH4~5の試料について30~35試料/時間の分析が可能である。また彼らは、同様の FIAシステムにより酸塩基の滴定も行っている<sup>7)</sup>。

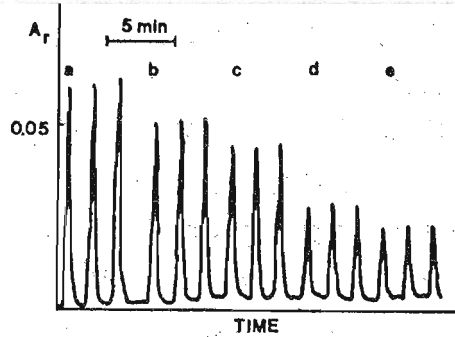


Fig. 4 FIA for HCl solutions:  
 (a)  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ; (b)  $7 \times 10^{-5} \text{ M}$ ; (c)  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  
 (d)  $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ; (e)  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  <sup>5)</sup>

## 2.2 カリウムイオンなどの陽イオンの測定

カリウムイオンなどの陽イオンの選択的計測においては、イオノフォアと呼ばれる陽イオンの選択的抽出試薬を用いることが多い。以下に紹介する方法もすべてイオノフォアにより高い選択性を付与するものであり、用いるイオノフォアを選択することによって、種々のイオン選択性を有する検出器を開発することができる。

### 2.2.1 ラングミュア-プロジェクト(LB)膜と膜電位蛍光プローブを用いた陽イオンの選択的計測<sup>8-11)</sup>

Wolfbeisらは、イオン電極の応答機構を模して、LB膜を用いた陽イオンの光学的計測法を開発している<sup>8)</sup>。これは、膜電位に応答する蛍光プローブをLB膜内に含有させ、陽イオンが膜に抽出されて生じた膜電位変化を蛍光法により測定するものである。彼らが作製したLB膜は、Fig. 5に示すように、アラキジン酸を脂質化合物し、膜電位プローブであるローダミンB誘導体(試料溶液への溶出を抑えるためローダミンBにオクタデシル基を導入)およびカリウムイオンのイオノフォアであるバリノマイシ

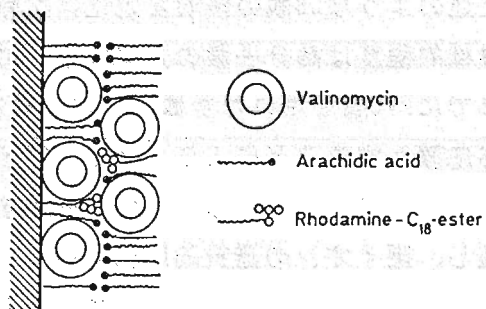


Fig. 5 Schematic cross-section of arachidic acid bilayer <sup>8)</sup>

ンを含有させた構造となっている。試料溶液中のカリウムイオンはバリノマイシンにより選択的にLB膜に抽出され、生じた膜電位変化はローダミンB誘導体からの蛍光強度変化として観測される。彼らは、作製したLB膜累積基盤をフローセル内に取り付けて、連続的にカリウムイオン濃度の測定を行っている。その検出器応答をFig. 6に示す。このように、検出器応答はカリウムイオンに選択的であるが、ナトリウムイオンにも応答している(Fig. 6A)。そこで、バリノマイシンを含まないLB膜の応答(Fig. 6B)も測定し、これを非選択的な検出器応答として差し引くことにより、カリウムイオンだけに選択的な応答(Fig. 6C)を得ている。また、LB膜の脂質化合物の選択、LB膜の累積回数の最適化により、さらに応答のダイナミックレンジ、選択性に優れた検出器が開発できることを報告している<sup>9)</sup>。さらに、ナトリウムイオン<sup>10)</sup>あるいはカルシウムイオン<sup>11)</sup>のイオノフォアを用いて、それぞれのイオンに対して選択的な応答が得られている。

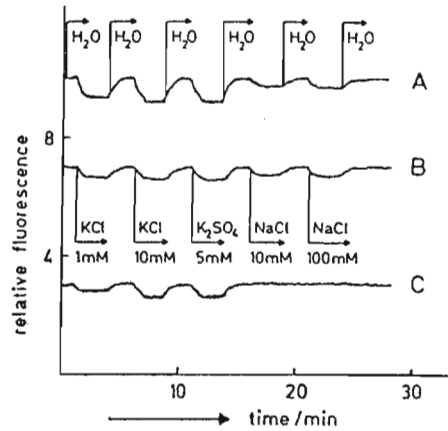


Fig. 6 (A) Response of LB bilayer with valinomycin; (B) response of LB bilayer without valinomycin; (C) difference curve (A)-(B)<sup>8)</sup>

### 2.2.2 ポリ塩化ビニル(PVC)膜とpH呈色試薬を用いた陽イオンの選択的計測<sup>12)</sup>

13)

上述のようなLB膜の熱的安定性は比較的優れていると報告されている<sup>9)</sup>が、膜の機械的強度は高分子膜の方がはるかに優れているものと考えられる。また、これまでにPVC膜を用いた多数のイオン電極が開発されており、このPVC膜を光学的な感応膜とすることにより、種々の陽イオンの選択的計測が行えるものと考えられる。そこで、Seilerらは、pHに応答する呈色試薬とイオノフォアを含むPVC膜を作製し、陽イオンの選択的計測を行っている<sup>12)</sup>。彼らの開発したフローセルの構造をFig. 7に示す。pH呈色試薬であるETH5294(Fig. 8)とアンモニウムイオンのイオノフォアであるノナクチン/モナクチン混合物を含むPVC膜(数 μm厚)を直径35 mmの石英板上に作製し(Fig. 7中の4)、この石英板を2枚、セル内で向かい合わせ

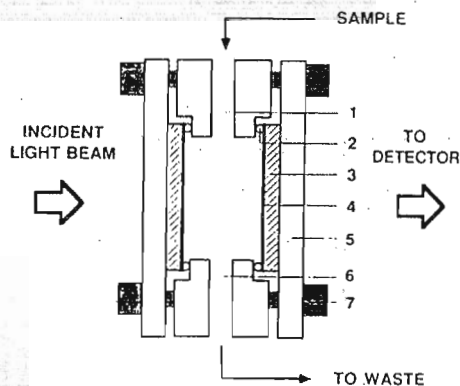


Fig. 7 Schematic representation of flow cell: (1) sample inlet; (2) O-ring; (3) quartz glass; (4) ion-sensing membrane; (5) plexiglas cell wall; (6) sample outlet; (7) set screw <sup>12)</sup>

た構造となっている。アンモニウムイオンはイオノフォアにより選択的にPVC膜に抽出され、このときpH呈色試薬からプロトン

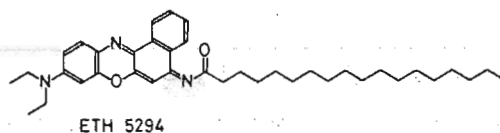


Fig. 8 Chromoionophore ETH5294 <sup>13)</sup>

が解離するため、その吸光度が変化する。Fig. 9に示すように、アンモニウムイオンに対するフローセル応答は可逆的であり、アンモニウムイオン電極に匹敵する選択性が得られている。さらに、カルシウムイオンのイオノフォアを用いることにより、カルシウムイオンに選択的なフローセル型検出器も開発されている<sup>13)</sup>。

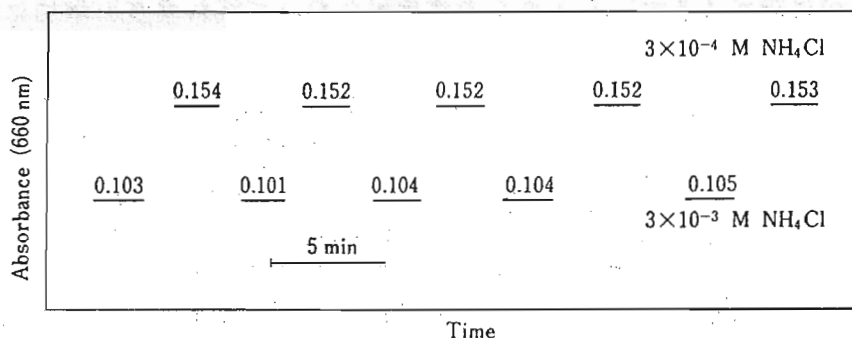


Fig. 9 Absorbance response of ion-sensing membranes for sample changes between  $3 \times 10^{-4} \text{ M}$  and  $3 \times 10^{-3} \text{ M}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  <sup>12)</sup>

2.2.3 ポリ塩化ビニル(PVC)膜と疎水性蛍光プローブを用いた陽イオンの選択的計測<sup>14-16)</sup>

著者らも、Seilerらと同様、イオン電極に用いられるPVC膜を光学的な感応膜とすることにより種々の陽イオンの選択的計測が行えるものと考え、PVC膜と蛍光プローブを用いたフローセル型検出器を開発している<sup>15)</sup>。まず、カリウムイオンのイオノフォアであるバリノマイシンと蛍光プローブであるヘキサデシルアクリジンオレンジ(h-AO<sup>+</sup>)を含むPVC膜を作製する。ここで、h-AO<sup>+</sup>は正に荷電した発色団と脂溶性が高い長鎖アルキル基をもった蛍光色素であり、発色団周囲の極性が増大すると蛍光強度が減少する疎水性蛍光プローブとして有用である。カリウムイ

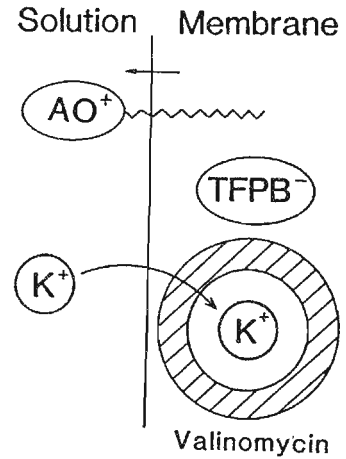


Fig. 10 Response mechanism of PVC membrane

オンに対するPVC膜の応答機構をFig. 10に示す。はじめにh-AO<sup>+</sup>はPVC膜内にあり、膜内の極性が低いため強い蛍光が得られる。次に、試料溶液中のカリウムイオンはバリノマイシンにより選択的に膜内に抽出され、h-AO<sup>+</sup>の発色団(AO<sup>+</sup>)はイオン交換的にPVC膜から試料溶液へと移動する。このとき発色団周囲の極性が増大し、膜からの蛍光強度が減少する。また、h-AO<sup>+</sup>は長鎖アルキル基を膜内に残したままで、その発色団のみがPVC膜⇄試料溶液を移動するため、膜から溶け出すことはなく、可逆的な応答が得られる。このPVC膜をフローセル内に取り付けて、Fig. 11に示すシングルラインのFIA装置を作製し、カリウムイオンの分析を行った。その結果、Fig. 12に示すように、ミリモルの濃度域において試料濃度の増加にともな

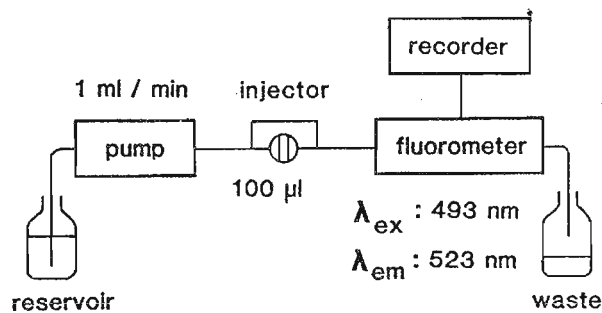


Fig. 11 FIA manifold for measurement of potassium ion

い大きな信号ピークが得られ、試料注入速度は15回/時間であった。また、1 mMのカリウムイオンについて10 mMのナトリウムイオンが共存しても、ピーク高さは1%以下の誤差しか生じず、高いカリウムイオン選択性を有していた。さらに、イオノフォアとしてポリナクチンを用いて、アンモニウムイオンの選択的検知も行っており<sup>16)</sup>、本法が種々の陽イオンの選択的計測法として有用であることを明らかにしている。

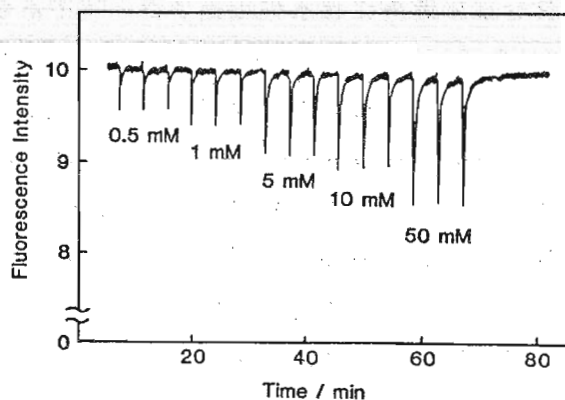


Fig. 12 Signal peaks at various concentrations of potassium ion

#### 2.2.4 多孔質ガラスと疎水性蛍光プローブを用いた陽イオンの選択的計測<sup>17)</sup>

これまで吸光あるいは蛍光試薬とイオノフォアをともに固定化した検出器による陽イオンの計測方法について述べてきたが、Wernerらはイオノフォアのみを固定化した蛍光検出器を用い、蛍光試薬を含む試料溶液をキャリア液流れに注入して、陽イオンのFIAを行っている。彼らの開発したFIA装置をFig. 13に示す。まず、カリウムイオンのイオノフォアであるクラウンエーテル化合物を多孔質ガラス表面に吸着させて固定化し、これをフローセルに充填する。次に、カリウムイオン

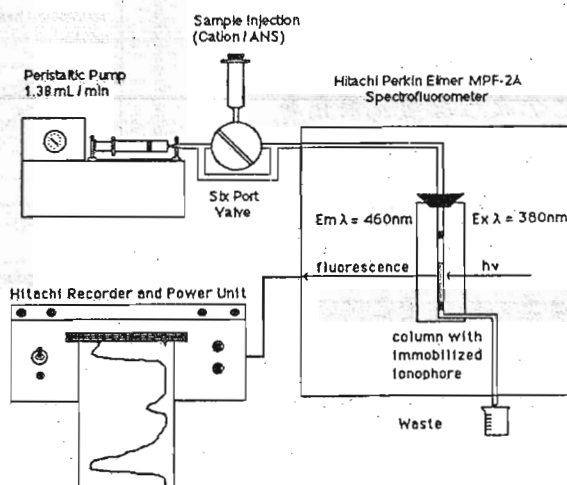


Fig. 13 Diagram of flow injection apparatus<sup>17)</sup>

を含む試料溶液に疎水性蛍光プローブである8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸(ANS)を添加し、これをキャリア液流れに注入する。フローセルにおいて、カリウムイオンは多孔質ガラス表面のクラウンエーテル化合物と選択的に結合し、さらにカリウムイオン-クラウンエーテル錯体は陰イオンであるANSとイオン対を形成する。ANSは分子周囲の極性が低くなると強い蛍光を発する疎水性蛍光プローブであり、極性の低い多孔質ガラス表面でイオン対を形成するため、フローセルからの蛍光強度が増大する。また、ナトリウムイオンやアンモニウムイオンのイオノフォアを用いて、これら陽イオンの選択的FIAも行っている。

### 3. 陰イオンの計測

陰イオンとしてハロゲンイオンの計測法について概説する。まず、Urbanoらは蛍光試薬の蛍光がハロゲンイオンによって強く消光されることを利用して、ハロゲンイオンの光学的な計測を行っている<sup>18)</sup>。彼らは、蛍光色素であるアクリジンあるいはメトキシキノリンをガラス板上に固定化し、これをフローセル内に取り付けて、塩素イオンなどによる蛍光消光よりハロゲンイオン濃度の連続測定を行っている。得られたハロゲンイオンの検量線をFig. 14に示す。塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオンの順に蛍光消光の度合が増大するため、分析感度も増加する。また、臭素イオンおよびヨウ素イオンについては、メトキシキノリンを用いた検出器のほうがわずかに感度が高いと報告されている。このような蛍光消光を利用した検出法は、消光作用をもつ化学種(ハロゲンイオン、酸素、二酸化イオンおよびハロセンなど)の計測には有用であるが、その選択性は乏しい。そこで、Russellらはカルセインプルーとジルコニウムを用いて、フッ素イオンの選択的計測を行っている<sup>19)</sup>。Fig. 15にその応答機構を示す。まず、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体からなる高分子樹脂に

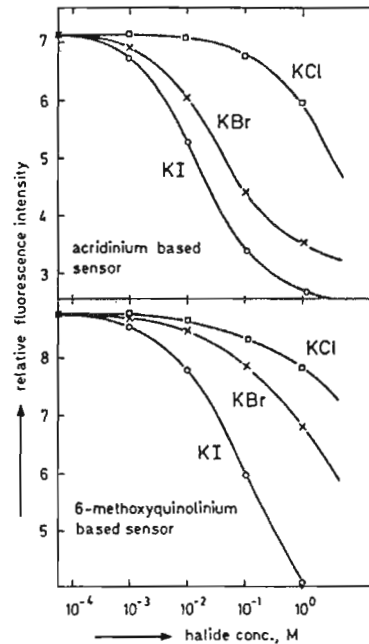


Fig. 14 Relative fluorescence intensities at various halide concentrations <sup>18)</sup>



蛍光試薬であるカルセインブルーを吸着させて固定化し、次に樹脂を塩化酸化ジルコニウム溶液に浸して、ジルコニウムキレート形成させる。カルセインブルーは強い蛍光を示すが、ジルコニウムキレートを形成すると蛍光スペクトルは短波長側に移動し、その蛍光強度も減少する。試料であるフッ素イオンはこのジルコニウムキレートに選択的に配位して、3成分錯体が生成し、わずかに蛍光強度が増大する。これを利用してフッ素イオンの検知を行う。高いフッ素イオン選択性が得られるが、分析感度が低く、検出器応答も不可逆であるため、FIA系に用いるときにはなんらかの工夫が必要である。

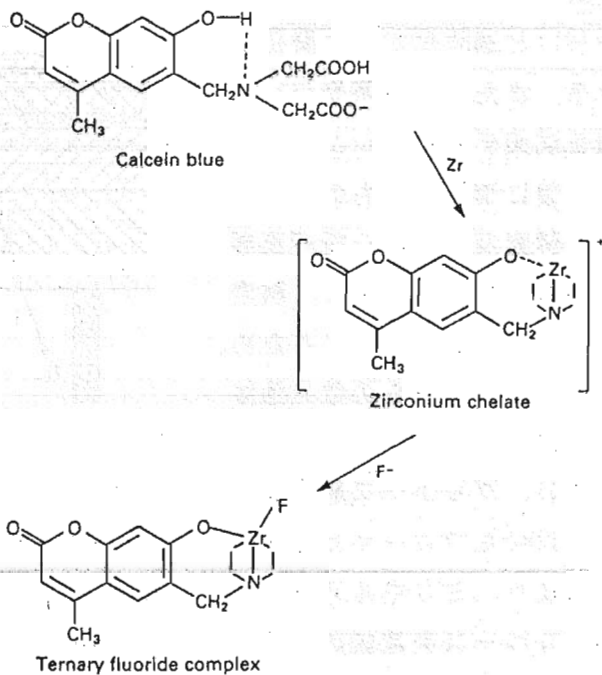


Fig. 15 Formation of zirconium chelate and fluoride ternary complex from calcein blue <sup>19)</sup>

#### 4. 生体関連試料の計測

グルコースなどの生体関連試料を直接、選択的に分析するための呈色試薬はほとんどない。したがって、その光学的な計測においては、試料の酵素反応で生成あるいは消費される化学種を上述のように光学的に計測する方法が一般的であり、酵素反応の特異性を利用するため高い選択性が得られる。

##### 4.1 グルコースの計測

Lubbersら<sup>20)</sup>、あるいはTrettnakら<sup>21)</sup>は、グルコースオキシダーゼによりグルコースがグルコノラクトンに酸化されるとき酸素消費を、酸素による蛍光消光を利用して光学的にモニターし、これによりグルコース濃度を測定する方法を開発している。Fig. 16にTrettnakらの開発したグルコース感応部の構造を示す。グルコースオキシダーゼを固定化したナイロン膜(N)において、グルコース(Glu)は

酸素存在下、グルコノラクトン(GL)と過酸化水素に酸化される。また、指示薬層(I)は、蛍光試薬デカシクレンをシリコン膜に溶解したものである。この酵素反応により指示薬層内の酸素濃度が減少し、酸素による蛍光消光が弱まるため、デカシクレンからの蛍光強度が増大する。Fig. 17に示すように、グルコース感应部を取り付けたフローセル型検出器により、ミリモルオーダーのグルコースを連続的に測定できる。さらに、Dremelらは同様な検出器を用いて、グルコースのFIAを行っている<sup>22)</sup>。彼らの開発したFIA装置により、0.1~500 mMのグルコースを60試料/時間以上の試料注入速度で分析できる。また、ワインや果汁などの実試料についても測定を行い、その有用性が示されている。

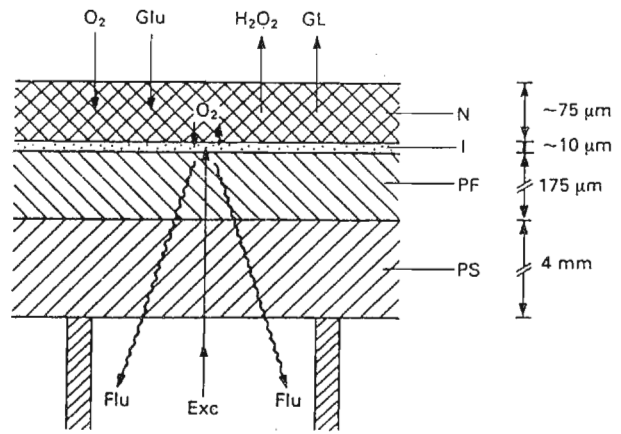


Fig. 16 Cross-section through sensing layer of glucose sensor: PS, plexiglas support; PF, polyester film; Exc, exciting light; Flu, Fluorescence <sup>21)</sup>

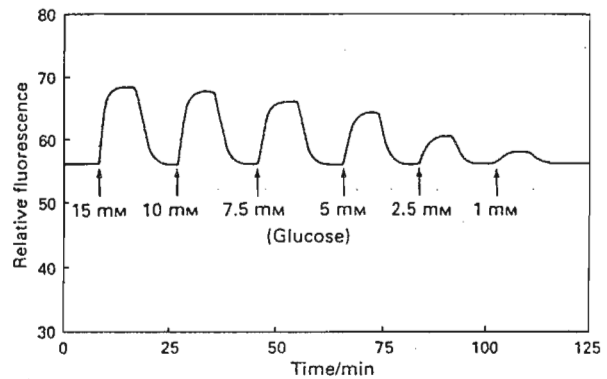


Fig. 17 Time-response curve for glucose sensor <sup>21)</sup>

#### 4.2 ペニシリンの計測

Verianらは、彼らのグループで開発したフローセル型pH検出器<sup>5)</sup>とペニシリンの加水分解酵素であるペニシリナーゼを用いて、ペニシリンのFIAを行っている<sup>23)</sup>。彼らは、pH呈色試薬とペニシリナーゼをセルロース膜に固定化して、これをフローセル内に取り付けた検出器を作製し、ペニシリンの加水分解生成物であるペニシリン酸によるpH変化を吸光法により測定している。試料注入量と感度、検出器の応答時間、キャリア液のイオン強度や緩衝能と検出器応答、固定化pH試薬

や固定化酵素の寿命など、実用面における詳細な検討が行われている。

## 5. おわりに

以上のように、FIA法においてその試料検出部に固定化試薬を用いることにより、流路の数を減少することが可能であり、さらに高価なイオノフォアや酵素などを消費することなく、連続的かつ選択的に計測することができる。その実用性は概ね固定化試薬の寿命によって決まるものと考えられるが、現在種々の試薬並びに化学的固定化方法が提案されており、今後測定対象となる化学種の拡大とともに、安定な固定化試薬も利用可能になるものと思われる。このような固定化試薬により、さらに簡便で高性能なFIA系が開発できるであろう。

## 参考文献

- 1) G. F. Kirkbright, R. Narayanaswamy, N. A. Welti, *Analyst*, 109, 15 (1984).
- 2) T. P. Jones, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, 60, 404(1988).
- 3) H. Offenbacher, O. S. Wolfbeis, E. Furlinger, *Sensors and Actuators*, 9, 73(1986).
- 4) O. S. Wolfbeis, H. Offenbacher, *Sensors and Actuators*, 9, 85(1986).
- 5) B. A. Woods, J. Ruzicka, G. D. Christian, *Anal. Chem.*, 58, 2496 (1986).
- 6) B. A. Woods, J. Ruzicka, G. D. Christian, N. J. Rose, *Analyst*, 113, 301(1988).
- 7) B. A. Woods, J. Ruzicka, G. D. Christian, *Anal. Chem.*, 59, 2767 (1987).
- 8) O. S. Wolfbeis, B. P. H. Schaffar, *Anal. Chim. Acta*, 198, 1(1987).
- 9) B. P. H. Schaffar, O. S. Wolfbeis, A. Leitner, *Analyst*, 113, 693 (1988).
- 10) B. P. H. Schaffar, O. S. Wolfbeis, *Mikrochim. Acta*, 1989III, 109.
- 11) B. P. H. Schaffar, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 217, 1(1989).
- 12) K. Seiler, W. E. Morf, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Sci.*, 5, 557 (1989).

- 13) W. E. Morf, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chem.*, 62, 738 (1990).
- 14) Y. Kawabata, R. Tahara, T. Kamichika, T. Imasaka, N. Ishibashi, *Anal. Chem.*, 62, 1528(1990).
- 15) 川畑祐司、今坂藤太郎、石橋信彦、第13回フローインジェクション分析講演会講演要旨集、36(1990).
- 16) Y. Kawabata, T. Kamichika, T. Imasaka, N. Ishibashi, *Anal. Chem.*, in press.
- 17) T. C. Werner, J. G. Cummings, W. R. Seitz, *Anal. Chem.*, 61, 211 (1989).
- 18) E. Urbano, H. Offenbacher, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.*, 56, 427 (1984).
- 19) D. A. Russell, R. Narayanaswamy, *Analyst*, 114, 381(1989).
- 20) D. W. Lubbers, N. Opitz, *Sensors and Actuators*, 4, 641(1983).
- 21) W. Trettnak, M. J. P. Leiner, O. S. Wolfbeis, *Analyst*, 113, 1519 (1988).
- 22) B. A. A. Dremel, B. P. H. Schaffar, R. D. Schmid, *Anal. Chim. Acta*, 225, 293(1989).
- 23) T. D. Yerian, G. D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, 60, 1250 (1988).