
能動輸送膜電極センサーの開発

Development of active transport membrane electrode sensors

- 代表研究者 北海道大学理学部教授 梅澤喜夫
Prof., Dept. of Chem., Faculty of Sci., Hokkaido Univ.
Yoshio UMEZAWA
- 協同研究者 北海道大学理学部助手 菅原正雄
Instr., Dept. of Chem., Faculty of Sci., Hokkaido Univ.
Masao SUGAWARA
- 北海道大学理学部助手 片岡正光
Instr., Dept. of Chem., Faculty of Sci., Hokkaido Univ.
Masamitsu KATAOKA
- 北海道大学大学院生 宇都正幸
Grad., Student, Dept. of Chem., Faculty of Sci., Hokkaido Univ.
Masayuki UTO

Transport of ions and molecules across biological cell membranes occurs in many cases against their concentration gradients, *i.e.*, by active transport. Incorporation of active transport phenomena into electrochemical sensing systems has been made by us for developing a new type of sensors, *i.e.*, uphill transport membrane electrodes. The advantageous characteristic of the uphill transport membrane sensor is that the sensor itself has an ability of amplifying concentration of analytes in solutions. This important feature stems from a relation between relative volume of feed (sample) *vs.* receiving (inner) solutions of an uphill transport membrane system and resulting concentration of analytes in each solution. By making volume of the inner filling solution of the sensor (receiving solution of uphill transport system) purposely very small, the sensor itself concentrates analytes in the inner solution. The resulting concentration of analytes in the sensor interior is much higher than in the sample solution and therefore, it is a much amplified measure of concentration of analytes in solutions.

The present study has dealt with the following research subjects:

- (1) Theoretical and experimental investigations on the relation between sensitivity of the sensor and volume of the inner filling solution (feed/receiving volume effect).
- (2) Development of a novel uphill transport membrane system that can enhance efficiency of uphill transport of ions.
- (3) Improvement of response time of the sensor.

1. Theoretical treatment of the feed/receiving volume effect has been made for two different modes of uphill transport, *i.e.*, antiport and symport. The amounts (moles) of primary ions transported from a constant volume of a feed solution into varying volumes of a receiving solution have been calculated based on the equations derived. The results show that, for the both modes of transport, the concentration of primary ions in the receiving solution, $C = (\text{moles of ions transported}) / (\text{volume of receiving solution})$, increases with decreasing the volume of receiving solution. Furthermore, analytes are more efficiently concentrated into the receiving solution by antiport than by symport. These theoretical predictions agree with the experimentally observed results with some uphill transport membrane sensors constructed in the present study.

2. A novel uphill transport membrane system modeled after ATPase systems in biological cell membranes has been developed for enhancement of the amount of ions transported. A model ATPase membrane system designed here for K^+ -ion uphill transport utilizes two carriers in the

membrane: one for K^+ ions and the other for pumping ions. The amount of K^+ ions transported into the receiving solution by this system is much higher than by the conventional system which uses only one carrier for primary ions (K^+ ions).

3. An attempt of improving response time of the sensor has been made by decreasing thickness of liquid membranes through which an analyte is transported. The liquid membrane having a thickness of several μm has been mounted directly on top of an underlying electrode by means of surface polymerization of nylon films. The small pores of the nylon film thus prepared support an organic liquid phase. A Cd(II)-ion transport membrane sensor with the carrier-impregnated nylon film, as an illustrative example, has been constructed and the time-resolved response of the sensor has been examined. Shortening of the response time of the sensor was not appreciable. Further investigations are necessary for improving the response time of this type of sensors.

研究の目的

いろいろな化学センサーの開発は現在、最も重要な課題の一つとなっている。通常のセンサーではイオン、分子がセンサー感応膜へ濃度勾配に従って拡散し検知される。これとは異なり、本研究では生体膜もっている著しい特徴である、膜表面でイオンや分子を認識し、かつ細胞内外に濃度勾配に逆らって、しかも高選択的に物質を輸送している現象（能動輸送）をセンサーとしての機能の理想と考え、できるだけそれを模倣した人工液膜を開発し、センサーに一体化することによって全く新しいタイプのセンサーの開発を行なう。

能動輸送ないし uphill（上り坂）輸送の原理を用いた本センサーの特徴は、本来センサーで検出しようとする物質の濃度が希薄なとき、それを生体膜と同様に外部から pH やイオンの濃度勾配、光、酸化還元、錯形成などのエネルギーを供給することにより、センサー内での濃度を uphill に増幅し、かつ高選択的に検知できる点にあり、従来のセンサーの概念と比較し、極めて新奇なものである。

このような特徴をもつ本法を新しいセンサーとして一般化し、実用化するために必要な基礎の確立および応用の拡大、さらに生体膜類似性を向上させるべく、次の3点を重点的に検討、考察を加えた。

- (1) センサーの感度を支配する要因である電極内部溶液の体積の微小化。
- (2) センサーの高感度化のために外部供給エ

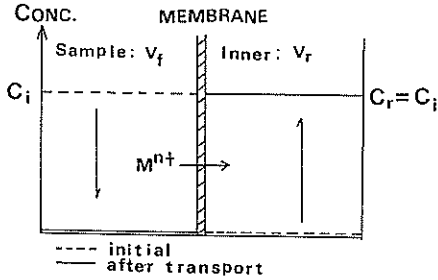
ネルギーを循環できる輸送システムの開発。

- (3) センサーの応答時間を短くするための液膜の薄膜化。

研究の成果と考察

1. センサーの感度と内部溶液の体積について
能動輸送ないし uphill 輸送の原理を用いるセンサーの特徴は、溶液中のイオンの濃度を見掛け上高めて検出できることである。センサーの高感度化のための最も重要な要件は、センサーの内部溶液（uphill 輸送の受容槽）の体積をできるだけ小さくすることであり、それにより内部溶液中に目的とするイオンが見掛け上濃縮される。図1は uphill 輸送系の供給槽の体積を変えたときに、受容槽でのイオンの濃縮がどのようになるかを示している。体積が V_f の供給槽中のイオンは膜を通過して体積 V_r の受容槽へと輸送される。それに従って供給槽のイオンの濃度（初濃度 C_i ）は減少し、受容槽のイオンが増加する。この輸送は外からの注入エネルギーを消費することによって、受容槽に輸送されたイオンの濃度が供給槽のそれを越えても続く。供給槽と受容槽の体積が等しい場合 ($V_f = V_r$) には、すべてのイオンが uphill に輸送されたとしても受容槽でのイオン濃度 (C_r) は供給槽での初濃度 (C_i) を越えることはない (Fig. 1a)。受容槽の体積が著しく小さい $V_r \ll V_f$ の場合、わずかな量のイオンの移動が受容槽での濃度を著しく高め、初濃度を越えて $C_r \gg C_i$ になることが期待できる (Fig. 1b)。この受容槽（センサー

A) $V_f = V_r$



B) $V_f \gg V_r$

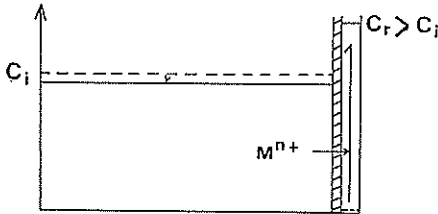


Fig. 1. Relation between relative volume of feed vs. receiving solution in uphill transport membrane system and resulting concentration change in each solution.

V_f , volume of a feed solution; V_r , volume of a receiving solution; C_i , initial concentration of an analyte in a feed solution; C_r , concentration of an analyte in a receiving solution transported across the membrane from a feed solution.

内部溶液)と供給槽(試料溶液)との間の体積比に基づく濃縮効果を uphill 輸送の二つの様式, アンチポートとシンポートの場合について定量的に検討した。

Fig. 2 に示すような対向輸送モデルでは目的イオンは供給槽から受容槽へ移動し, ポンピングイオン(外部からの注入エネルギー)はそれと反対方向へ移動する(アンチポート)。目的イオン i はポンピングイオン j と 1:1 の交換により輸送される。この対向輸送系では

- (1) キャリア X は目的イオンとポンピングイオンのそれぞれに結合し膜中を透過するが, キャリアは i と j の両方に同時に結合した複合体 ijx は形成しない。
- (2) キャリアの膜中濃度は一定に保たれる。

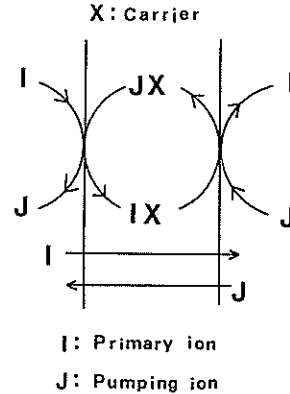


Fig. 2. A model for counter-transport (anti-transport).

(3) 膜中の成分 ix および jx の膜中における移動度は同じである。

(4) 遊離のキャリア x は膜を透過しない。

このような場合, 定常状態において目的イオンの正味の flux はポンピングイオンの逆方向の flux に等しく (1:1) の交換, 両イオンの flux がいずれも零になる平衡の条件は

$$\frac{C_i^r}{C_i^f} = \frac{C_j^r}{C_j^f} \quad (1)$$

である。ここで C_i , C_j はそれぞれ i および j イオンの濃度を表し, 添字 r は受容槽を, f は供給槽を示す。

いま, 体積 V_f の供給槽中の n moles の目的イオンが膜を透過して体積 V_r の受容槽へ運ばれ, 一方, n moles のポンピングイオンが逆方向へ移動し平衡に達したとすれば (Fig. 3), Table 1 に示す関係が成り立つ。この関係を式 (1) に代入することによって, 受容槽に輸送された目的イオンのモル数 n は, それぞれのイオンの初濃度と両槽の体積を用いて式 (2) により与えられる。

受容槽へ輸送された目的イオンのモル数

$$n = \frac{C_i^0 C_j^0}{C_i^0/V_r + C_j^0/V_f} \quad (2)$$

また, 受容槽における目的イオンの平衡濃度 C_r ($= n/V_r$) は

$$C_r = \frac{C_i^0 C_j^0}{C_i^0 + C_j^0 (V_r/V_f)} \quad (3)$$

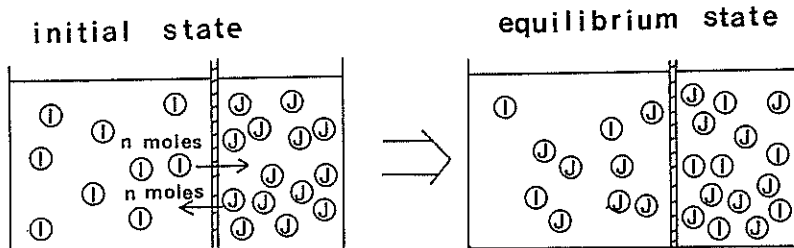


Fig. 3. Schematic illustration of the mass balance in the case of antiport.
 N moles of a primary ion I in a feed solution and n moles of a pumping ion J in a receiving solution are transported to an opposite direction.

Table 1. Antiport system.

	Initial state		Equilibrium state	
	Feed	Receiving	Feed	Receiving
Primary ion	C_i^0	0	$C_i^0 - n/V_r$	n/V_r
Pumping ion	0	C_j^0	n/V_r	$C_j^0 - n/V_r$

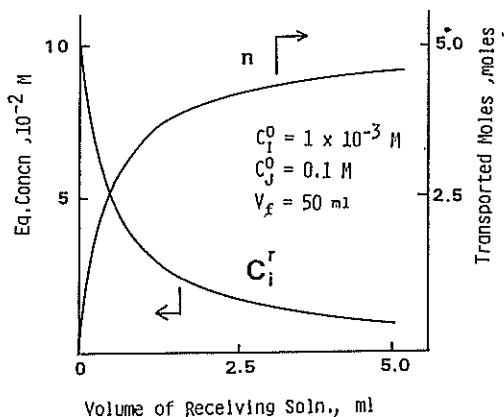


Fig. 4. Relative volume of feed vs. receiving solution and resulting concentration change of the primary ion in the receiving solution transported across the membrane from the feed solution in the case of antiport (Calculated from eqn. 3).

となる。Fig. 4 に示す結果は、供給槽の体積を一定に保ち受容槽の体積を変えて輸送を行なった場合に、受容槽へ運ばれた目的イオンのモル数とその濃度を式 (2) および (3) から計算により求められたものである。明らかに、受容槽の体積が小さくなるほど、目的イオンの濃度は高くなる。

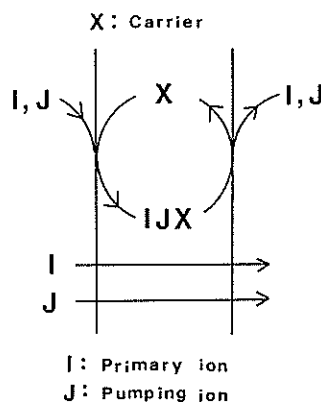


Fig. 5. A model for co-transport (symport).

シンポートの場合には、対向輸送と異なり、ポンピングイオンは目的イオンが輸送される方向と同じ向きに移動する。Fig. 5 に示す共輸送モデルでは膜を透過できるのは遊離のキャリア x と 3 者複合体 ijx だけである。すなわち目的イオン i はポンピングイオン j の流れに 1:1 に連結して移動することを意味する。この場合に i および j の flux が共に零になり流れがとまる条件は

$$\frac{C_i^r}{C_i^f} = \frac{C_j^f}{C_j^r} \quad (4)$$

である。対向輸送の場合と同様な考察に基づい

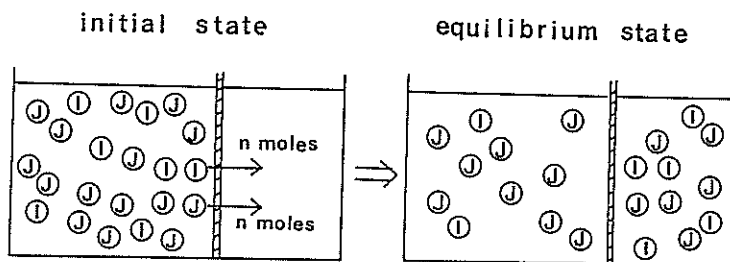


Fig. 6. Schematic illustration of the mass balance in the case of symport.

N moles of a primary ion I and n moles of a pumping ion J in a feed solution are transported in the same direction across the membrane into the receiving solution.

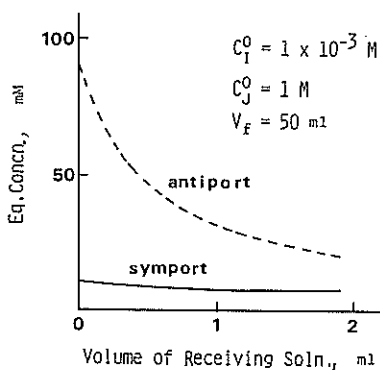


Fig. 7. Relative volume of feed vs. receiving solution and resulting concentration change of the primary ion in the receiving solution transported across the membrane from the feed solution in the case of symport (Calculated from eqn. 6).

て、受容槽の体積と輸送されるイオンの濃度との関係を求めることができる。いま、 n moles の目的イオンと n moles のポンピングイオンが受容槽から供給槽へ移動して平衡に達したとすれば (Fig. 6), Table 2 に示す関係が得られる。この条件を平衡時における釣合を表す式 (4) に代入して受容槽へ輸送された目的イオンのモル数を求めると式 (5) が得られる。

$$n = \frac{V_r(C_i^0 + C_i^0)}{2\left(\frac{V_f}{V_r} - \frac{V_r}{V_f}\right)} + \frac{\sqrt{V_r^2(C_i^0 + C_i^0)^2 - 4(V_f^2 - V_r^2)C_i^0 C_i^0}}{2\left(\frac{V_f}{V_r} - \frac{V_r}{V_f}\right)} \quad (5)$$

また、そのときの目的イオンの濃度 C_i^r は

$$C_i^r = \frac{(C_i^0 + C_i^0) + \sqrt{(C_i^0 + C_i^0)^2 + 4(A^2 - 1)C_i^0 C_i^0}}{2\left(A - \frac{1}{A}\right)} \quad (6)$$

ただし

$$A = V_f/V_r > 1$$

によって与えられる。供給槽の体積を一定に保ち、受容槽の体積を小さくした時に、受容槽へ輸送される目的イオンの濃度を式 (6) から計算により求めた (Fig. 7)。受容槽の体積を小さくすると、受容槽での目的イオンの濃度は高くなるが、その増加の程度は対向輸送に比べて著しく低い。この結果は uphill 輸送の体積効果に基づいてイオンを濃縮し、センサーの増感をめざす上で、シンポートの形態をとる輸送系は不利なことを意味する。

上に述べた uphill 輸送における体積効果の考

Table 2. Symport system.

	Initial state		Equilibrium state	
	Feed	Receiving	Feed	Receiving
Primary ion	C_i^0	0	$C_i^0 - n/V_f$	n/V_r
Pumping ion	C_j^0	0	$C_j^0 - n/V_f$	n/V_r

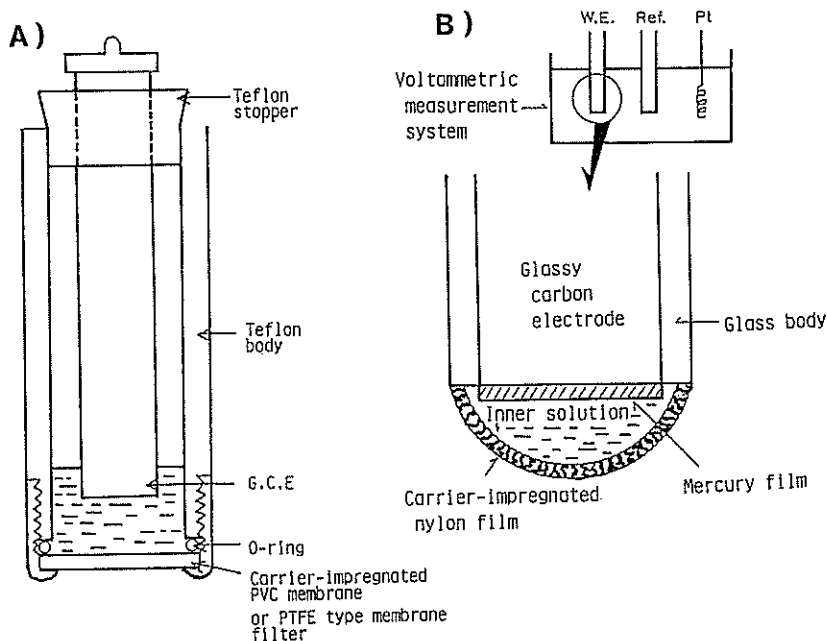


Fig. 8. Structure of an uphill transport membrane electrode.
 (A) An electrode with a carrier-impregnated PVC film or a carrier-impregnated membrane filter.
 (B) An electrode with a carrier-impregnated nylon film.

FEED SOLN. (50 ml)	MEMBRANE NPOE:PVC:DBM	RECEIVING SOLN. (0.3 - 1.5 ml)
pH 5 (acetate) 2×10^{-4} M CuSO_4	4 : 4 : 1	5 M HCl

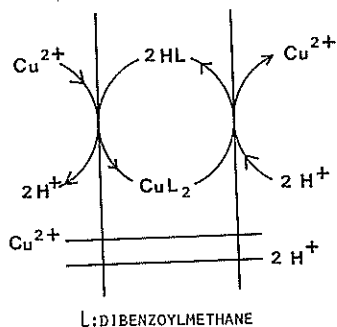


Fig. 9. Dibenzoylmethane-mediated uphill transport membrane system for copper(II) ions.

察に基づけば、センサーを組み立てる際に考慮すべき点は当然センサーの内部溶液の体積ができる限り小さくなるように uphill 輸送を実現できる液膜を保持することである。作成した uphill 輸

送膜センサーの構造を Fig. 8 に示す。Fig. 8(a) の電極は含浸型液体膜と呼ばれる uphill 輸送膜を用いたものであり、疎水性のメンブランフィルターの細孔にキャリアを含む液膜を浸して作成する。もう一つの電極はナイロン-2,12 ポリマーを界面重合の技術により成膜し、その細孔に液膜を保持させている。前者のタイプの電極ではその内部溶液の体積は $300 \mu\text{l}$ 程度に小さくでき、後者の電極では $50 \mu\text{l}$ 以下とすることができる。含浸型液体膜タイプのセンサーを用いて溶液中の銅イオンを検出する場合を例に、センサーの内部溶液を小さくすることによる応答シグナル（電流値）の増大とそのときの銅イオン濃度の増幅を検証した。この銅イオン uphill 輸送膜センサーの輸送システムは Fig. 9 に示す対向輸送系である。Fig. 10 に示すように、内部溶液の体積が小さくなるほど電流値は大きくなり、銅(II)イオンの濃度は体積が $300 \mu\text{l}$ の場合に 11 倍に増幅される。このような体積効果に基づくセンサーの増感には錯形成のエネルギーを用いる uphill 輸送系を組み

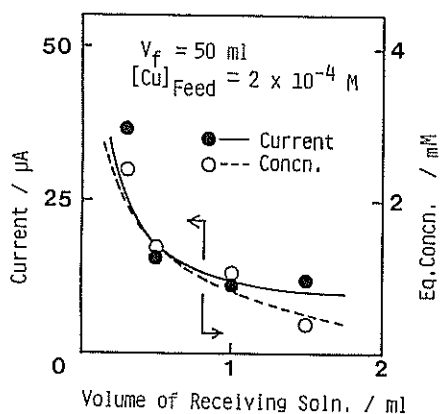


Fig. 10. Amplification of response signal (currents) of a copper(II)-ion uphill transport membrane sensor by decreasing the volume of the inner filling solutions.

込んだ場合にも現れる。Fig. 11 に示すカドミウム(II)イオンの uphill 輸送系を内蔵するナイロン薄膜型の uphill 輸送膜センサーを用い、その内部溶液の体積を変えてカドミウム(II)を検出したときの電流値およびそのときの内部溶液のカドミウム濃度を Table 3 に示す。増幅(濃縮)度は最高で 74 倍に達する。このとき試料溶液のカドミウム(II)濃度の減少は非常に少なく、目的イオンの濃度を事実上変えることなくセンサー感度の増大が得られたことになる。

共輸送(シンポート)の形態の uphill 輸送によっても受容槽の体積を小さくすることにより目的とするイオンを濃縮できる。Fig. 12 には、カリウムイオン uphill 輸送システム(Fig. 13)によるカリウムイオン輸送量と受容槽の体積の関係を示

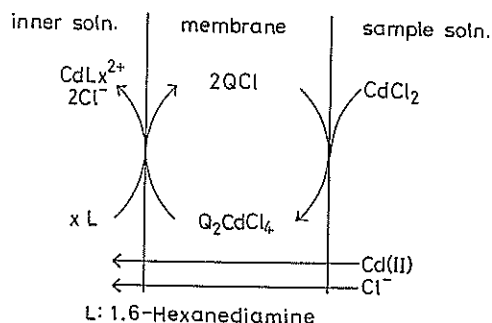


Fig. 11. Tri-*n*-octylmethylammonium chloride (QCl)-mediated uphill transport membrane system for Cd(II) ions.

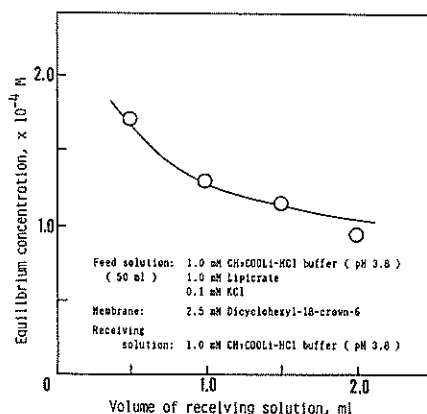


Fig. 12. Relative volume of feed vs. receiving solution and resulting concentration change of K^+ ions in the receiving solution transported across the membrane from the feed solution (see Fig. 13 for the membrane system).

Table 3. Effect of the volume of inner solution on amplification of current intensities at a Cd(II) uphill transport membrane electrode.

Inner volume ^{a)} (μ l)	Differential pulse peak current (i_p/μ A)	Degree of amplification (i_p/i_{MFE}) ^{b)}	Concentration of Cd(II) in inner solution ^{c)} (ppm)
30	440	37.6	53.7
40	213	18.2	34.0
1000 ^{d)}	85	7.3	12.1

Sample solution (50 ml): 1.0 ppm Cd(II) in $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl (pH 5).

^{a)} 1,6-Hexanediamine solution. ^{b)} $i_{MFE} = 11.7 \mu\text{A}$, the current intensity of 1.0 ppm Cd(II) in $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl at a conventional MFE having the same surface as the uphill transport membrane electrode. ^{c)} Determined by aas, After transport time of 3 h. ^{d)} Carrier-impregnated membrane filter (PTFE type) was used.

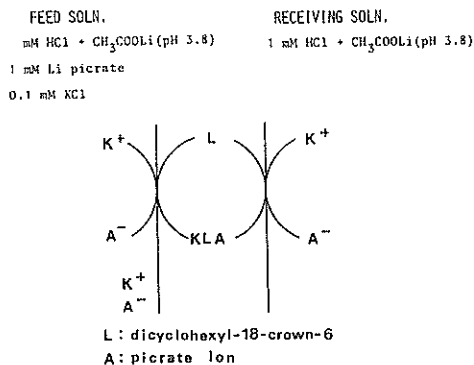


Fig. 13. Dicyclohexyl-18-crown-6(DC18C6)-mediated uphill transport membrane system for potassium ions.

す。明らかにカリウムイオンは濃度勾配に逆らって輸送され、受容槽に濃縮されるが、受容槽の体積を小さくしていても濃縮度はそれほど高まらない。この事実は先述の理論的考察と合致する。

2. エネルギー循環 uphill 輸送系の開発

人工液膜を用いて、目的物質をその濃度勾配に逆らって輸送するためには、目的物質に連結して移動するプロトンや他のイオンの濃度勾配、酸化還元ポテンシャルなどの外部からの注入エネルギーを必要とする。このエネルギーは目的イオンの輸送とともに液膜の一方から他方へ移動し消費される。生体系での能動輸送には、消費したエネルギーを汲み上げ再利用する仕組みが存在する。例えば腸管および腎臓でのグルコースの細胞内への取り込みはグルコース輸送蛋白に結合したナトリウムイオンとグルコースの共輸送（シンポート）により行なわれるとされている (Fig. 14A)。ナトリウムイオンの濃度勾配が大きいほど輸送の効率は高く、細部外のナトリウムイオン濃度が下がり濃度勾配が小さくなると輸送効率は低下する。このため、細胞内に入り込んだナトリウムイオンを Na⁺, K⁺-ATPase によって細胞外へ運び出し、その濃度勾配を保つ機構が働く。生体系と同様に人工液膜系においても、外部からの注入エネルギーを膜の一方から他方へ、さらに元の側へと循環させることができれば、uphill 輸送の効率が高まり、それによって uphill 輸送膜センサーの感度が著しく向上することが期待される。人工液膜系

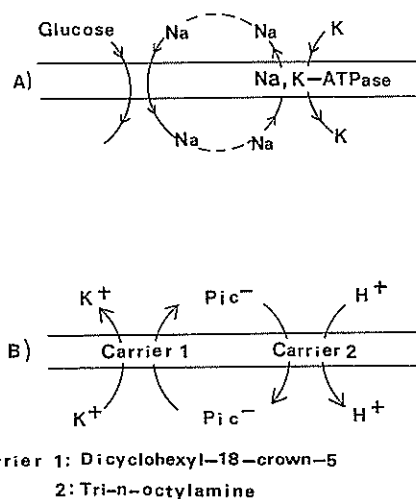


Fig. 14. Active and uphill transport membrane systems.

- (A) A proposed scheme for active transport of glucose in biological system.
(B) A model ATPase membrane for uphill transport of K⁺ ions.

を用いて外部注入エネルギーを循環させる例はなく、その基礎の確立は重要と思われる。

Fig. 14B には生体系での Na⁺, K⁺-ATPase の役割を参考にして考案したエネルギー循環 K⁺ イオン uphill 輸送システムを示す。目的イオンのカリウムイオンはキャリアであるジシクロヘキシル-18-クラウン-6 によってピクリン酸イオンの濃度勾配に従う流れに連結して膜を透過し、受容槽へ uphill に運ばれる。受容槽側界面でカリウムイオンが放出されると同時にピクリン酸イオンが遊離する。このピクリン酸イオンは、再び、プロトンの受容槽側から供給槽側へ向かう濃度勾配によって、キャリアであるトリオクチルアミンに結合して供給槽側へ uphill に運ばれる。

まず、Fig. 14B のエネルギー循環 uphill 輸送が実現できるかどうかを知るための基礎として、(1) ピクリン酸イオンの濃度勾配によってカリウムイオンを uphill に輸送できるか、(2) pH 勾配によってピクリン酸イオンを (1) の受容槽から供給槽へ uphill に汲み上げることができるかについてそれぞれの輸送系を単独に構成することによって検討した。ジシクロヘキシル-18-クラウ

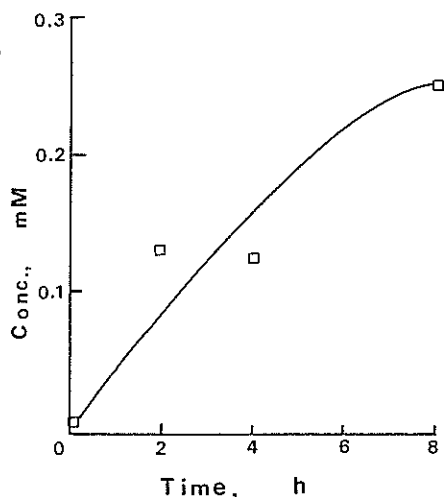


Fig. 15. Uphill transport of potassium ions as a function of time through the dichlorobenzene membrane containing 2.5 mM DC18C6.
 Feed solution (50 ml): 1 mM lithium picrate, 0.1 M LiOH.
 Receiving solution (2 ml): 0.5 M CH₃COOLi-HCl buffer (pH 3.8).
 Initial concentration of KCl in the feed solution was 1.0×10^{-4} M.

ン-6 をキャリアに用いてカリウムイオンを輸送したときの輸送時間と受容槽へ運ばれたカリウムイオン濃度との関係を Fig. 15 に示すカリウムイオン濃度が供給槽での初濃度を越えても輸送は続き、8 時間の輸送で、受容槽のカリウムイオン濃度は初濃度の 2.7 倍に増幅される。この結果は、カリウムイオンがその濃度勾配に逆らって体積のより小さい受容槽へ濃縮されることを示す。Fig. 16 にトリオクチルアミンをキャリアに用いてピクリン酸イオンを輸送した時の輸送量と輸送時間の関係を示す。内部溶液（カリウム輸送の受容槽）のピクリン酸イオン濃度は輸送時間とともに急激に減少し、外部溶液（供給槽）のピクリン酸イオン濃度がわずかに増加する。すなわち、ピクリン酸イオンはカリウムを uphill 輸送する際の受容槽側から供給槽側へ自らの濃度勾配に逆らって輸送される。外部溶液のピクリン酸イオンの濃度の増加が少ないのはその体積が内部溶液に比べて十分に大きいためである。

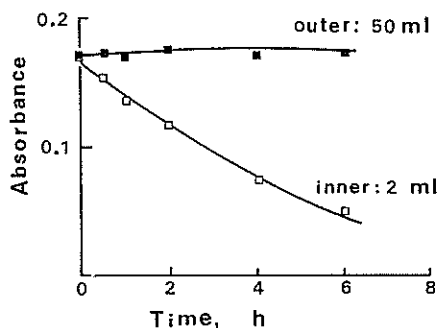


Fig. 16. Uphill transport of picrate ions as a function of time through the dichlorobenzene membrane containing 2.5 mM tri-*n*-octylamine (TOA)
 Inner (feed) solution (2 ml): 0.1 M CH₃COOLi-HCl (pH 3.1).
 Outer (receiving) solution (50 ml): 0.1 M LiOH.
 Concentration of potassium picrate present initially in the inner and outer solutions was 1 mM.

これらの結果に基づけば、(1) と (2) の uphill 輸送系を組み合わせることでポンピングイオンとしてのピクリン酸イオンを循環できる。Fig. 14 のポンピングイオン循環システムをもつ uphill 輸送系によるカリウムイオンの輸送効率をピクリン酸イオンのシンポートに基づく通常の uphill 輸送系での輸送効率と比較した。その結果は Fig. 17 に示す。明らかに、前者の輸送の形態の方が受容槽へ運ばれるカリウムイオンの濃度が高く、ポンピングイオンのピクリン酸を受容槽から供給槽へ運び出すことが輸送効率を高めるうえで有効なことを示している。

このように uphill 輸送を駆動する外部エネルギーを循環できるシステムを開発し、輸送の効率が通常の uphill 輸送系に比べて明らかに高くなることを実証した。エネルギー循環に基づく uphill 輸送量の増加は当然センサーに一体化した場合にセンサー内での見掛けの濃度の増幅になり、センサーのより高い感度が期待できる。外部注入エネルギーを循環させる効果は、前述の体積効果を考慮に入れるならば供給エネルギーがセンサー内部溶液から外部溶液へ移動するアンチポー

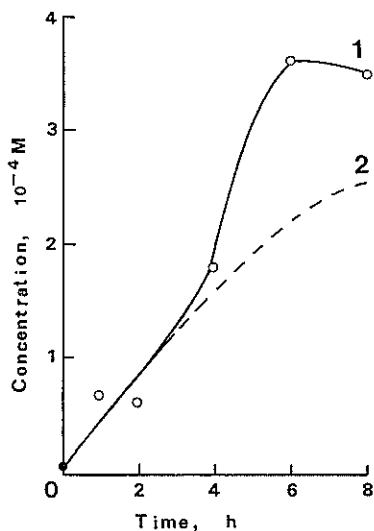


Fig. 17. Enhanced uphill transport of K^+ ions as a function of time through the model ATPase membrane containing 2.5 mM DC18C6 and 2.5 mM TOA in dichlorobenzene.
 Feed solution (50 ml): 1 mM lithium picrate, 0.1 M LiOH.
 Receiving solution (2 ml): 0.5 M $CH_3COOLi-HCl$ buffer (pH 3.8).
 Initial concentration of KCl in the feed solution was $1.0 \times 10^{-4} M$.

トの場合よりも内部溶液へ向かうシンボートの様式の uphill 輸送系に有効と思われる。

3. センサーの応答時間と液膜の薄膜化について

これまでに作成した uphill 輸送膜センサーの応答時間は長く、時間のオーダーである。この応

答時間の問題を解決するために、液膜を薄膜化していくことが必要である。含浸型液体膜の膜厚は $80 \mu m$ であるが、この膜厚を薄くしていくと目的物質が液膜を拡散、透過する時間が短くなり、センサーの応答速度は速くなると予想される。理想的には脂質二分子膜層の 100 \AA 程度までに薄くしていくことが望ましいが、その第一段階としてナイロン-2,12 界面重合膜を応用することによって、その細孔に液膜を含浸して作成した厚さ数 μm 程度の uphill 輸送膜を作成した (Fig. 8b)。ナイロンポリマー膜は水銀薄膜被覆グラシーカーボン電極表面に 1,6-ヘキサジミアミン溶液の適量 (通常 $30 \sim 40 \mu l$) を載せ、これを二塩化セバコイルのシクロヘキサンクロホルム (4:1) 混合溶液に浸して界面重合を行なうことにより容易に作成できる。電極の先端部にできたナイロン薄膜部分をキャリアを含む有機相に浸し、液膜を含浸する。この電極では界面重合に用いたヘキサジミアミンモノマー溶液をそのまま内部溶液として用いるが、液膜を含浸する前に透析によって内部溶液を必要に応じた組成に置換できる。

一般に、ナイロン成膜の時間が短いほど、膜厚は薄くなり、かつ膜の密度が小さく (空孔率は大) なって含浸液膜の有効面積が増えると考えられる。そのため、重合時間が短いほど試料溶液の目的とするイオンが内部溶液へ運ばれる速度は速くなることが予想される。例として、カドミウムイオン uphill 輸送膜センサーを用い、ナイロンポリマーを成膜するときの重合時間を変えることにより、センサーの濃縮効率と応答時間を調べた。

Table 4. Amplification of current intensities at a Cd(II) ion uphill transport electrode with nylon film membrane with different polymerization times.

Polymerization time (min)	Differential pulse peak current ($i_p/\mu A$)	Degree of amplification (i_p/i_{MFE}^a) ^{b)}	Concentration of Cd(II) in inner solution ^{b)} (ppm)
5	632	54.0	74.4
10	440	37.6	53.7

Sample solution (50 ml): 1.0 ppm Cd(II) in $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl (pH 5),
 Inner solution ($30 \mu l$): 1,6-Hexanediamine,
 Transport time: 4 h.

^{a)} $i_{MFE} = 11.7 \mu A$, see Table 1. ^{b)} Determined by aas.

このセンサーの uphill 輸送システムは Fig. 11 に示したものであり、試料溶液側と内部溶液側におけるカドミウム錯体の安定度の違いに基づく錯形成のエネルギーを用いてカドミウムイオンを uphill に輸送する。輸送の結果は Table 4 に示すように重合時間の短い方が内部溶液のカドミウム濃度は高い値を示した。また、最大の電流値に達するまでの輸送時間を調べた結果、5分の重合反応で作成した膜と10分の膜の間には有意の差は認められなかった。これは重合時間の短い方がヘキサジアミンモノマーの消費量が少なく、その分錯形成のエネルギーが大きくなるために濃縮効率が高まり、平衡に到達する時間が延びたと推定される。

以上のようにこのタイプの電極の応答時間を短縮するには重合条件を変えることによって膜厚を厳密に制御する必要があることがわかった。現在のセンサーの応答時間である時間のオーダーを分あるいは秒のオーダーに短縮することが今後の課題である。そのアプローチとして脂質二分子膜を用いることは現在の約1万分の1まで薄膜化できることになり自然と思われる。

4. 今後の課題

今回の研究によって uphill 輸送膜センサーの基礎知見が蓄積された。この新しいセンサーが従来のセンサーに比べて優れた感度をもつことは明らかである。センサーの応答時間の問題を解決することが将来的にこのセンサーを一般化する上で最も重要な課題である。そのために電気生理学の分野ではルーチン手法である patch-clamp の技術を導入することもその一つである。それによ

り 100Å 程度の脂質二分子膜での輸送が実現できると思われる。さらに、脂質二分子膜レベルでの研究は内部溶液の体積の極小化が必然であり、かつ生体膜類似性を高めることでもある。

研究発表

- 1) M. Uto, H. Yoshida, M. Sugawara, and Y. Umezawa: Uphill transport membrane electrodes, *Anal. Chem.*, 58, 1789-1803 (1986).
- 2) 宇都正幸, 菅原正雄, 梅澤喜夫: キャリアー含浸ナイロン薄膜を用いる上り坂輸送膜センサー, *日化*, 4, 89-494 (1987).
- 3) 梅澤喜夫: 膜界面における物質の認識に関する基礎研究. *分析化学*, 35, 559-573 (総合論文), (1986).
- 4) H. Yoshida, M. Sugawara, and Y. Umezawa: *Anal. Chem.*, in preparation.
- 5) M. Sugawara, M. Omoto, H. Yoshida, and Y. Umezawa: *Anal. Chem.*, in press.
- 6) Y. Umezawa, M. Uto, H. Abe, W. Takami, M. Sugawara, M. Kataoka, Y. Yasuda, and E. Kimura: Uphill transport and some other biomimetic membranes for specific detection of ions and molecules, *Proceedings of Symposium on Bioelectroanalysis* (1986, Oct., Hungary), Akadémiai Kiadó, Budapest 1987.
- 7) M. Sugawara, M. Uto, H. Yoshida, and Y. Umezawa: Uphill transport membrane electrodes, *International Symposium on New Sensors and Methods* (1986, Nov., Kyoto).
- 8) 吉田仁士, 宇都正幸, 菅原正雄, 梅澤喜夫: Uphill 輸送膜センサーの基礎開発, 日本化学会秋季年会 (1986年10月, 名古屋).
- 9) 森田有亮, 吉田仁士, 菅原正雄, 梅澤喜夫: Uphill 輸送膜センサーの基礎開発, 日本化学会春季年会 (1987年4月, 東京).
- 10) Y. Umezawa: Uphill transport membrane sensors, 40th ACS Annual Symposium on Analytical Chemistry (1987, June, Bloomington, U.S.A.).