第四級アンモニウム塩を用いた高分子支持膜型塩化物イオン電極の測定精度と選択性

柴田康久®, 沖 直人^{*}, 小沢 理^{**}, 宮城宏行^{*}

(1993 年 8 月 5 日受理)

第四級アンモニウム塩を感応物質とする塩化物イオン電極の測定精度と選択性について検討した。管理血清と健常者尿を測定したときの精度に及ぼす共存イオンの影響を調べたところ、塩化物イオン電極の精度には硫酸イオンの影響が大きいことが分かった。3 種類の塩化物イオン電極で上記生体液を測定したときの誤差分散と選択性の比較から、精度向上には硫酸イオンなどの親水性イオンに対する選択性を高め、同時に親油性イオンに対する親和性を抑制することの重要性が明らかになった。又、無機陰イオン以外に各種の有機酸イオンや薬剤に対する高選択性化も必要であることが示唆された。本研究で用いた 3 種類の塩化物イオン電極の中で最も選択性のすぐれた、テトラオクタデシルアンモニウム塩を感応物質に用いた電極は患者生体液（血清、血漿、尿）の高精度な分析に極めて有効であった。

1 緒 言

イオン電極は迅速・簡便な測定が可能であるため、近年は生体液中の各種電解質（ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、塩化物イオンなど）の分析に盛んに利用されている。中でも塩化物イオンの測定には銀/塩化銀を用いた固体膜型電極、又は第四級アンモニウム塩を感応物質とする高分子支持膜型電極が実用化された¹⁾。しかし、前者はハロゲンイオンの影響を受けやすく²⁾、後者はチオシアン酸イオンや過塩素酸イオンに代表される親油性イオンに対する選択性が十分とは言えない³⁾。それゆえ、患者血清の分析において測定精度が問題となる場合があり^{4)~6)}、その原因として透析患者に特有な高分子量の有機成分や臭素含有薬剤に基づく臭化物イオン及び酸塩基平衡の崩れに伴って生じた硝酸イオンの影響などが解明された。

塩化物イオン電極の選択性を高めて精度向上を図ることを目的に、第四級アンモニウム塩以外の感応物質の開発^{7)~11)}や可塑剤に注目した研究¹²⁾¹³⁾が行われた。著者ら¹⁴⁾¹⁵⁾は第四級アンモニウム塩を感応物質とする塩化物イオン電極に注目し、選択性向上の観点から各種可塑

剤や感応物質の電極特性に対する影響などを系統的に調べた。この一連の研究において数種類の塩化物イオン電極で管理血清や健常者尿を測定したところ、試料や電極により精度が大幅に異なることが分かった。

本研究では、塩化物イオン電極で種々の血清や尿試料を分析したときの妨害イオンの有無をイオンクロマトグラフ（以下、IC と記す）を用いて調べ、妨害の程度や電極の選択性との関係などを明らかにした。又、研究例のほとんどない、塩化物イオン電極の測定精度と選択性との関係についても総合的に検討し、その高精度化を図るための指針を得た。

2 実 験

2・1 試薬及び試料

塩化物イオン電極の感応物質にはジメチルジオクタデシルアンモニウム塩（DMDODA, 関東化学）、テトラオクタデシルアンモニウム塩 [TODA, Fluka（スイス）] 及びメチルトリドデシルアンモニウム塩 [MTDDA, Polysciences, Inc.（アメリカ）] の 3 種類を、可塑剤には選択性や応答性など¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾の点から 1-トリデシルアルコール（東京化成工業）、又は *o*-ニトロフェニルオクチルエーテル（同仁化学研究所）と 1-テトラデシルアルコール（東京化成工業）の混合物を用いた。その他の試薬にはすべて特級品（和光純薬工業）を用いた。生体液には市販の管理血清、患者から採取した血清、血漿及

* (株)日立製作所計測器事業部: 312 茨城県勝田市市毛 882

** (株)日立製作所中央研究所: 185 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1-280

Fig. 1 Correlation of analytical results of Cl^- measurements in control serum samples by a chloride counter and chloride ion-selective electrodes (Cl-ISEs) with different sensing materials

(A): dimethyldioctadecylammonium salt (DMDODA), (B): tetraoctadecylammonium salt (TODA), ①~⑧: control serum samples with large interference (①~⑦) and no interference (⑧)

び尿と薬剤を服用していない健康者の尿を用いた。

2.2 感応膜及び電極の製作

DMDODA, TODA 及び MTDDA を感応物質とする 3 種類の塩化物イオン電極（それぞれ DMDODA 電極, TODA 電極, MTDDA 電極と記す）は既報¹⁴⁾に従って製作した。塩化物イオン電極と比較電極には測定装置に応じてプローブ型とフロースルー型電極を使い分けた。電池の構成は既報¹⁴⁾と同じにした。

2.3 測定装置

生体液の測定にはプローブ型電極を用いる 705 形生化学自動分析計（日立, 31 倍希釈）とフロースルー型電極を用いる 736 形及び 7050 形生化学自動分析計（日立, それぞれ 16 倍及び 31 倍希釈）を用いた。塩化物イオン電極の比較対照には実用基準法の電量滴定法に基づく G1-3 形クロライドカウンタ（平沼産業）又は 710 形電解質分析計（日立）を使用した。生体液の分離検出には IC を使い, L-6000 形ポンプ（日立, 1 ml/min）, 7125 形サンプルインジェクタ（レオダイン, 20 μl ）, 分離カラム [日立, パックドカラム（# 2710, 4 mm i.d. $\times$ 50 mm）], L-3500 形電導度検出器（日立）, 655A-52 形カラム恒温槽（日立, 40°C）及び D-2000

形クロマトインテグレータ（日立）で構成した。溶離液には 0.45 mmol/l のフタル酸水素カリウム溶液を用いた。

2.4 測定方法

塩化物イオン電極の選択係数はことわりのない限り既報⁶⁾と同じく JIS¹⁸⁾ の混合溶液法（b 法）に準じて求めた。尿は血清や血漿と同様に測定前に希釈せず, そのままを生化学自動分析計の測定試料とした。又, IC には限外ろ過ユニット（日本ミリポア, 分画分子量: 10000）を用いて除タンパクし, 脱イオン水で希釈した血清と尿（それぞれ 10 倍, 30 倍希釈）を測定試料とした。

3 結果と考察

3.1 測定精度の比較

DMDODA 電極と TODA 電極で管理血清を測定したときの同時再現性は RSD（相対標準偏差）で 0.3~0.4% とほぼ同じであったが, 電極法と電量滴定法による測定値の相関には明らかな相違が見られた。結果を Fig. 1 に示したが, 誤差分散を表す $S_{y \cdot x}$ ¹⁹⁾ の比較から DMDODA 電極の精密性は TODA 電極の約 1/4 であることが分かる。しかし, DMDODA 電極に大きな

Table 1 Analytical values of healthy human urine samples by Cl^- -ISEs based on DMDODA and TODA

Sample	Cl^- -ISE/ mmol l^{-1}		Coulometry/ mmol l^{-1}
	DMDODA	TODA	
①	259	228	225
②	250	207	208
③	234	219	214
④	318	251	245
⑤	153	133	139
⑥	308	239	232
Correlation coefficient	0.954	0.999	—
S_{yx} (mmol l^{-1})	19.9	2.24	—

妨害を与えた 7 種類 (Fig. 1 の ①～⑦) を除いて測定精度を調べたところ, DMDODA 電極の S_{yx} ($n=13$, $r=0.997$, $Y=1.09X-10.5$) は 1.13 mmol/l に減少し, TODA 電極 ($n=13$, $r=0.996$, $Y=1.01X-1.74$, $S_{yx}=1.14 \text{ mmol/l}$) と同等であった. どちらの電極も精密性が向上したことから管理血清 ①～⑦ には妨害イオ

ンが含まれ, DMDODA 電極はその妨害を受けやすいと言える. 次に健常者尿の測定結果を Table 1 に示したが, TODA 電極の S_{yx} は管理血清の場合と同程度であった. 一方, DMDODA 電極の S_{yx} は管理血清を測定したときの約 2 倍であり, TODA 電極で健常者尿を測定したときの約 9 倍であった. 血清と尿に対する S_{yx} の差から尿には管理血清よりも DMDODA 電極に妨害を与えるイオン種が多いか, あるいは妨害イオンを多く含むことが推定された.

3・2 IC による共存イオンの分析

3・2・1 共存イオンの分離検出 IC を用いて得られた標準溶液, DMDODA 電極に大きな妨害を与えた管理血清 (Fig. 1 の ⑦) 及び妨害をほとんど与えなかった管理血清 (Fig. 1 の ⑧) のクロマトグラムを Fig. 2 に示した. どちらの管理血清からも 3 種類の陰イオンが検出され, 標準溶液の保持時間 (R.T.) からリン酸一水素イオン (R.T.=1.2 分), 塩化物イオン (R.T.=2.3 分) 及び硫酸イオン (R.T.=6.7 分) と考えられた. 上記管理血清のクロマトグラムでは硫酸イオンのピーク高さに際立った差が見られた. 又, Fig. 1 の管理血清

Fig. 2 Chromatograms of standard solution (A) and control serum samples with (B) and without (C) interference

①: $1.04 \text{ mmol l}^{-1} \text{ HPO}_4^{2-}$, ②: $2.82 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cl}^-$, ③: $1.25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Br}^-$, ④: $1.61 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NO}_3^-$, ⑤: $1.04 \text{ mmol l}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$; Sample (B): ⑦ in Fig. 1, (C): ⑧ in Fig. 1

Fig. 3 Chromatogram of a healthy human urine sample without any medicines

①～⑥を測定したときにも⑦の試料と同様のクロマトグラムが得られた。一方、患者血清（クロライドカウンタ：104 mmol/l, DMDODA 電極：105 mmol/l）のクロマトグラムは管理血清⑧のそれと類似しており、塩化物イオン以外にリン酸一水素イオンと極めて微量と思われる硫酸イオンだけが検出された。更に、健常者尿（Table 1 の④）のクロマトグラムを Fig. 3 に示したが、4種類の陰イオンが検出され、標準溶液との比較からリン酸一水素イオン、塩化物イオン、硝酸イオン（R.T.=4.3分）及び硫酸イオンと考えられた。

血清と尿のクロマトグラムからリン酸一水素イオン濃度の試料間差は小さいと思われた。又、試料に硫酸イオンが多く含まれると（管理血清⑦と健常者尿④）、硝酸イオンの有無によらず DMDODA 電極に対する妨害は大きいことも分かった。従って、本実験で検出された共存イオンの中ではリン酸一水素イオンや硝酸イオンよりも、硫酸イオンによる妨害の方が大きいことが分かった。

3・2・2 共存イオンの定量 本実験の測定条件ではリン酸一水素イオンの高精度な定量は困難と考えられたので、硝酸イオンと硫酸イオンのみ定量した。管理血清中の硝酸イオンは検出限界以下であったが、硫酸イオン

Fig. 4 Influence of SO_4^{2-} concentration on measurement errors of Cl-ISEs based on DMDODA(A) and TODA(B)

は Fig. 1 の①～⑦の試料には 8.7～18.3 mmol/l, 残りの 13 試料には 0.2～2.2 mmol/l 含まれていた。又、健常者尿中の硝酸イオンと硫酸イオン濃度はそれぞれ 1.0～6.1 mmol/l 及び 11.6～35.7 mmol/l であり、3.2 l の患者血清中の硫酸イオン濃度は 0.2 mmol/l であった。以上の分析結果から、DMDODA 電極に大きな妨害を与えた試料には共通して硫酸イオンが多く含まれていることが分かった。

3・3 硫酸イオン濃度と測定誤差

TODA 電極と DMDODA 電極に 1 mmol/l 以上の妨害を与えた管理血清と健常者尿に含まれる硫酸イオン濃度と測定誤差（電極法と電量滴定法の測定値の差）との関係を調べた。Fig. 4 に示したようにどちらの電極でも両者に相関が見られた。特に DMDODA 電極では良い相関性が得られたので、硫酸イオンは DMDODA 電極に対する妨害の主要原因物質であり、両電極に対する回帰直線の傾きは硫酸イオンに対する選択性の違いを示していると思われた。

3・4 測定精度と選択性

3・4・1 硫酸イオンに対する選択性 TODA 電極と DMDODA 電極の選択係数を Fig. 5 に示したが、チオシアン酸イオンなどの親油性イオンに対する選択性の差は小さかった。しかし、炭酸水素イオンや硫酸イオンなどの親水性イオンに対する選択性は顕著に異なり、中

Fig. 5 Selectivity factors of the Cl^- -ISEs based on DMDODA, TODA and MTDDA

でも TODA 電極の硫酸イオンに対する選択係数は DMDODA 電極よりも一桁以上小さい。それゆえ、硫酸イオンを多く含む試料を測定しても TODA 電極の誤差は小さいことが理解でき、生体液に含まれる場合のある臭化物イオン⁴⁾や硝酸イオン⁵⁾のような親油性イオンのみならず、親水性イオンである硫酸イオンに対しても選択性向上を図ることが管理血清や尿の高精度な分析には必須と考えられた。又、Fig. 4 に示した回帰直線の傾きは硫酸イオンに対する選択係数 (TODA 電極: 0.10, DMDODA 電極: 1.9) に近い値であった。しかし、両電極ともその傾きが硫酸イオンに対する選択係数よりもわずかに大きいのは、すべての試料で検出されたリン酸一水素イオンの影響などがあるためかもしれない。

3・4・2 測定精度と選択性の相互比較 MTDDA 電極を用いて 3・1 の健康者尿を測定したときの相関性を調べたところ、 S_{yx} は 5.4 mmol/l ($n=6$, $r=0.993$, $Y=1.12X+10.9$) であった。この結果は、MTDDA 電極の精度は TODA 電極の約 1/2 であるが、DMDODA 電極よりも約 4 倍すぐれていることを示す。そこで、塩化物イオン電極の測定精度と選択性について検討するため、MTDDA 電極の選択係数を求めて Fig. 5 に示した。硫酸イオンなどの親水性イオンに対する選択係数の序列は TODA 電極 $\leq$ MTDDA 電極 $<$ DMDODA 電極であり、これは管理血清と健康者尿を測定したときの S_{yx} の序列に一致した。ここで、DMDODA 電極の硫酸イオンに対する選択係数の序列が Hofmeister 順列から大きく外れており、リン酸一水素イオンも同じ傾向を示した。これには、長鎖と短鎖のアルキル基を 2 本ずつ

持つ DMDODA 特有の対症的な分子構造が二価多原子陰イオンとの静電的相互作用に何らかの影響を及ぼすためとも推定されるが、詳細は明らかではない。

第四級アンモニウム塩を感応物質とする塩化物イオン電極は、一般に親水性又は親油性イオンに対する選択性を高めると他方のイオンに対する選択性は悪くなる傾向を示す¹²⁾¹⁴⁾。実際、DMDODA 電極と MTDDA 電極にはその傾向が見られた。しかし、TODA 電極は上述の傾向を示さず、親油性イオンに対する選択係数の序列は DMDODA 電極 $\leq$ TODA 電極 $<$ MTDDA 電極であった。このような序列が得られたのは著者らが既報¹⁴⁾で明らかにした 4 本の長鎖アルキル基を有する TODA の特異性が現れたためと考えられるが、TODA 電極の親油性イオンに対する選択性の低下は小さいと言える。このことも TODA 電極の測定精度が他の電極よりもすぐれていたことに影響しているであろう。従って、高精度な塩化物イオン電極を開発するには親水性イオンに対する選択性の向上と同時に、親油性イオンに対する親和性を抑制することが重要と考えられた。

3・4・3 有機酸イオンと薬剤に対する選択性 生体液には無機陰イオン以外に種々の有機酸イオンや薬剤も含まれるため、代表的な化合物に対する選択性を調べて結果を Table 2 に示した。本実験で調べたすべての有機酸イオン、鎮痛・解熱剤及び催眠剤に対し TODA 電極は最も高い選択性を示すことが分かった。管理血清や健康者尿にも有機酸イオンは含まれており、これらの試料を測定したときの TODA 電極の精度を考慮すると、上記の結果は無機陰イオン以外に有機酸イオンや薬剤に対しても選択性を高めることが高精度な塩化物イオン電

Table 2 Selectivity factors to organic acid anions and drugs obtained by Cl^- -ISEs based on DMDODA, TODA and MTDDA

Interfering compound	Selectivity factor (k)		
	DMDODA	TODA	MTDDA
L-Ascorbate	0.36	<0.01	0.11
L-Aspartate	0.11	<0.01	—
Benzoate	0.33	0.16	2.0
Citrate	2.3	<0.01	3.0
Hippurate	0.25	0.14	—
Lactate	0.33	0.03	—
Oxalate	1.8	0.27	2.0
Aspirin	0.22 [†]	0.09 [†]	0.42 [†]
Barbital sodium	0.10	<0.02	0.80

[†] Obtained by single solution method

Table 3 Analytical results of patient physiological fluids by Cl-ISE based on TODA

Type	Sample number	Correlation coefficient	Regression line	$S_{yx}/\text{mmol l}^{-1}$
Serum	55	0.988	$Y=0.98X+1.33$	0.68
Plasma	50	0.995	$Y=1.02X+2.35$	0.69
Urine	38	0.999	$Y=1.03X+4.95$	2.41

極の開発につながることを示唆するものであろう。以上の結果から、TODA 電極を用いればそのすぐれた選択性ゆえに患者生体液も高精度に分析できることが期待された。

3・5 TODA 電極による患者生体液の分析

3・5・1 再現性 患者血清と尿を測定したときの同時再現性は RSD でそれぞれ 0.40% ($n=30$, $\bar{X}=102.6$ mmol/l), 0.33% ($n=30$, $\bar{X}=109.6$ mmol/l) と良好であった。

3・5・2 相関性 TODA 電極とクロライドカウンタで患者血清、血漿及び尿を測定し、相関性を調べた結果を Table 3 に示した。患者血清と血漿測定時の S_{yx} は約 0.7 mmol/l であり、個人の生理的変動幅 (S_p) に基づく許容限界 ($1/2S_p$, 1.1 mmol/l²⁰⁾) を十分に満足した。又、患者尿を測定したときの S_{yx} は血清や血漿測定時の約 3 倍であった。尿中塩化物イオン濃度の範囲は血液中よりも広く²¹⁾、更に精度に関する許容限界も提唱されていないが、上記の S_{yx} から判断すると、TODA 電極を用いれば個人の生理的変動を十分に把握できると思われる。又、回帰直線からも TODA 電極の測定値は電量滴定法のそれとよく一致すると言えよう。本実験により、TODA 電極は各種の患者生体液の高精度な分析に極めて有効であり、臨床検査への適用性が高いことを示すことができた。

終わりに、本研究を進めるにあたりご指導、ご討論いただいた故 W. Simon スイス連邦工科大学教授と有益なご助言やご協力をいただいた(株)日立製作所計測器事業部保田和雄博士、菅原研之氏及び櫻井美代子女史に深謝いたします。

文 献

- 鈴木周一: “イオン電極と酵素電極”, p. 12 (1981), (講談社).
- J. A. Lustgarten, R. E. Wenke, C. Byrd, B. Hall: *Clin. Chem.*, **20**, 1217 (1974).
- K. Hartman, S. Luterotti, H. F. Osswald, M. Oehme, P. C. Meier, D. Ammann, W. Simon: *Mikrochim. Acta* (Wien), **1978** II, 235.
- K. Emancipator, M. H. Kroll: *Clin. Chem.*, **36**, 1470 (1990).
- 梅本雅夫, 徳川竜治, 桑 克彦, 石田浩二: 日本臨床検査自動化学会誌, **15**, 427 (1990).
- 柴田康久, 広田邦男, 高田芳矩, 宮城宏行: 分析化学, **42**, 265 (1993).
- U. Wuthier, H. V. Pham, R. Zünd, D. Welti, R. J. J. Funck, A. Bezegh, D. Ammann, E. Pretsch, W. Simon: *Anal. Chem.*, **56**, 535 (1984).
- Y. Umezawa, M. Kataoka, W. Takami, E. Kimura, T. Koike, H. Nada: *Anal. Chem.*, **60**, 2392 (1988).
- R. Stepánek, B. Krautler, P. Schulthess, B. Lindemann, D. Ammann, W. Simon: *Anal. Chim. Acta*, **182**, 83 (1986).
- A. Hodinár, A. Jyo: *Chem. Lett.*, **1988**, 993.
- 鎌田薩男, 野村信治, 大橋弘三郎: 分析化学, **39**, 677 (1990).
- D. Wegmann, H. Weiss, D. Ammann, W. E. Morf, E. Pretsch, K. Sugahara, W. Simon: *Mikrochim. Acta* (Wien), **1984** III, 1.
- 石和田仁志, 鈴木孝治, 白井恒雄: 分析化学, **31**, 71 (1982).
- 柴田康久, 小沢 理, 沖 直人, 宮城宏行: 分析化学, **41**, 5 (1992).
- 柴田康久, 小沢 理, 宮城宏行: 分析化学, **42**, 77 (1993).
- K. Sugahara, K. Yasuda, J. Mori: USP 4,519,891 (1985).
- Y. Shibata, S. Ozawa, N. Oki, H. Miyagi: USP 4,936,975 (1990).
- JIS K 0122, イオン電極方法通則 (1981).
- 日本臨床化学会分析部会関東支部機器委員会: 臨床化学, 補冊, **16**, 287 (1987).
- 小沢恭一: “臨床用自動分析”, p. 170 (1985), (講談社).
- 巽 典之: “正常値ハンドブック”, p. 76 (1985), (南江堂).

- 鈴木周一: “イオン電極と酵素電極”, p. 12 (1981), (講談社).
- J. A. Lustgarten, R. E. Wenke, C. Byrd, B. Hall:

How selectivity affects the accuracy and precision of chloride ion-selective electrodes based on quaternary ammonium salts. Yasuhisa SHIBATA, Naoto OKI*, Satoshi OZAWA** and Hiroyuki MIYAGI* (*Instrument Division, Hitachi, Ltd., 882, Ichige, Katsuta-shi, Ibaraki 312; **Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd., 1-280, Higashikoigakubo, Kokubunji-shi, Tokyo 185)

A study into how selectivity affects the accuracy and precision of chloride ion-selective electrodes (Cl-ISEs) used in the analysis of physiological fluids is presented. In this study, dimethyldioctadecyl-, tetraoctadecyl- and methyltridodecylammonium salts (DMDODA, TODA and MTDDA, respectively) were used as sensing materials. Control serum and healthy human urine samples were analyzed by Cl-ISEs and the interfering anions in these samples were examined by ion chromatography in order to study the relation between error and selectivity. It was found that errors in the analysis of these samples were mainly due to the sulfate ion, because good correlation between its concentration and error was observed. From the comparison of selectivity and S_{yx} (standard deviation of y on x) obtained by three types of sensing materials, it was shown that a highly reliable Cl-ISE could be produced by an improvement of selectivity to hydrophilic anions such as sulfate ion without a strong affinity for lipophilic anions. Furthermore, it was also suggested that Cl-ISE should have a small selectivity factor to organic acid anions and drugs. The Cl-ISE based on TODA exhibited excellent selectivity and was applied to the analysis of patient physiological fluids (serum, plasma, urine); good accuracy and precision were obtained. Therefore, it is expected to be useful in the field of clinical analysis.

(Received August 5, 1993)

Keyword phrases

chloride ion-selective electrode; quaternary ammonium salt; selectivity; sulfate ion; ion chromatography.