ダブルジャンクション型微小参照電極と そのワンチップ Ca^{2+} イオンセンサへの応用

非会員 田浦 巧 (筑波大学)

正員 鈴木 博章 (筑波大学)

Microfabricated Double Junction Reference Electrode and its Application to a One-Chip Ca^{2+} Sensor
Takumi Taura, Non-member, Hiroaki Suzuki, Member (University of Tsukuba)

A one-chip Ca^{2+} ion sensor integrated with a micro double junction Ag/AgCl reference electrode was microfabricated. The thin-film Ag/AgCl element used in the reference electrode features a polyimide protecting layer and the AgCl layer grown from a slit in the polyimide layer. The container for the internal KCl solution and a liquid-junction were formed with an SU-8 thick-film photoresist. KCl was incorporated in the micro container in a solid powdered form and the area was passivated with a silicone rubber. Another junction was formed at the end of the passivation. The double junction reference electrode could maintain a stable potential for approximately 80 h. The Ca^{2+} ion-selective electrode was fabricated by forming an ion-selective membrane on one part of a silicon micro container formed by anisotropic etching. The one-chip Ca^{2+} ion sensor was constructed using the Ca^{2+} indicator electrode and the miniaturized liquid-junction reference electrode. A linear relationship was obtained between the indicator electrode potential and Ca^{2+} activity for Ca^{2+} activity higher than 10^{-4} . Sensitivity was 30.3 mV/decade.

キーワード: 参照電極, 銀/塩化銀, イオノフォア, Ca^{2+} センサ, 異方性エッチング

1. まえがき

医療分野において、血液成分の測定は疾患を知る上で重要である。血液電解質は、神経、筋肉機能、臓器機能、ホルモンの分泌などと密接に関わっている。このうち、悪性腫瘍、腎不全、消化器症状、骨軟化症などには Ca^{2+} イオンの異常が関係しており、その測定の重要性はきわめて高い。

近年、医療、福祉への関心の高まりとともに、微小で安価なマイクロセンサや、これらを集積化した μTAS (Micro Total Analysis System), あるいは BioMEMS (Micro Electro Mechanical System) と呼ばれる微小分析システムの研究が活発に進められている。これらの微小システムのうち、血液分析を目的としたものでは、しばしばポテンシオメトリックなイオンセンサが用いられる。それらには電位基準となる参照電極が必要であるが、従来のマイクロセンサ、マイクロバイオセンサの研究では、そのほとんどが指示電極側の微小化に留まっており、電解液成分の影響を受けにくい汎用的な微小参照電極の開発における成功例はほとんどない。

参照電極を微小化するため、これまでに幾つかの方法が

提案されてきた。大別すると、(1) 金属薄膜を直接被検液に接触させたもの、(2) 液絡のない固体参照電極と呼ばれるもの、(3) 液絡付き参照電極を微小化したものがある⁽¹⁾。

(1) は例えば薄膜状の銀/塩化銀を被検液を含む塩素イオンの活量が一定の水溶液に接触させたもので、簡便な方法であるが、一定電位を維持するためにイオンの活量を厳密に一定に保つ必要がある。(2) は銀/塩化銀電極で、適当な濃度の Cl^- イオンを Nafion 等の陽イオン交換膜で閉じこめたものなどである。しかし、膜の透過性により界面電位が発生したり、界面での分極などの問題が新たに生じることが考えられ、実用的ではない。結局、実用的には (3) が最も適していると考えられる。しかし、これにも問題がある。塩化銀は高濃度の KCl 中で錯イオン $\text{Ag}_n\text{Cl}^{-(n-1)}$ ($n = 2 \sim 4$) を形成して溶解する⁽²⁾⁻⁽³⁾。しかし、塩化銀層の極めて薄い従来の薄膜状銀/塩化銀参照電極構造においては、これが耐久性に大きく影響し、例えば飽和 KCl 中で長時間機能しうるものを得るのは極めて難しい。本研究では新型薄膜状銀/塩化銀構造を用いることにより、長時間機能しうるダブルジャンクション型参照電極を実現した。

微小イオンセンサの代表的なものに ISFET (Ion Sensitive

図1 液絡付き微小参照電極の構造 (a) 微小イオン電極の構造 (b)

Fig.1. Structure of the miniature double junction reference electrode (a) and the ion-selective electrode (b).

Field Effect Transistor)がある。上に述べた参照電極の問題は別として、これ自体は確立された技術である。しかし、構造が複雑で作製に手間がかかり、センサを微小システム中に組み込むにあたっては、必ずしも好ましくはない。このため、より単純な構造のセンサを実現すべく、イオン電極をそのまま微小化する試みもいくつかなされている⁽⁴⁾⁻⁽⁸⁾。本研究では、このようなシステム中に集積化することを考慮し、微小流路等、他の構成要素と複合化しやすい構造のイオン電極を作製した。また、この Ca^{2+} イオン電極を上記の参照電極と複合化し、ワンチップ Ca^{2+} イオンセンサを実現した。これらの作製方法と特性について述べる。

2. 実験方法

〈2・1〉 ダブルジャンクション型微小参照電極の作製

微小参照電極と後述するイオン電極の作製には、マイクロマシーニング技術を用いた。チップサイズはいずれも $13 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$ であり、3 インチのウエハから 90 チップを得た。参照電極とイオン電極で必要となる銀/塩化銀のパターンは、ガラス基板 (Corning, #7740) 上に形成した。その構造・寸法は同じである (図 1 (a), (b))。まず、クロムを密着層とし、パッドを含む金の U 字型骨格パターン (200 nm 厚) を形成した。次に U 字型構造を覆うように銀層 (300 nm 厚) を形成した。さらにポリイミドの保護層をチップ全体に形成した。銀層は周囲に形成された 6 個の貫通孔を通し、ポリイミド層により基板に強く固定された。またポリイミド層の中央部にはスリットが形成されており、塩化銀がここから銀層中に浸食するように形成された。塩化銀層は、1.0 M KCl-HCl 緩衝液 (pH 2.2) 中にて定電流 (3 μA) で形成した。ここで使用した銀/塩化銀では、主に銀層の 80% を塩化銀層に変えたものを使用した。後に述べるように、塩化銀層の量は薄膜状銀/塩化銀の寿命に大きく

影響する。

図 1 (a) に今回作製したワンチップ Ca^{2+} センサで電位基準として用いたダブルジャンクション型微小参照電極を示す。電位基準となるこの外部参照電極は、液絡を有し、内部に飽和 KCl 電解液を満たした汎用的なものとした。前述のポリイミド層上に 80 μm 厚の厚膜レジスト層 (Micro Chem 製, NANO SU-8) を形成し、内部電解液貯蔵用容器、内部液絡、サンプル溶液を取り込み KCl のサンプル溶液中への流出を抑えるための区画を形成した。 K^+ の流出により Ca^{2+} イオン濃度の測定に影響が出ないように、ダブルジャンクション型構造とした。この区画には親水性のポリマー (関西ペイント製, ENT-2000) を充填した。この参照電極では内部電解液中の KCl が常に外部に流出してゆくため、長寿命化には KCl をできる限り多く貯め込むことが必要である。そこで、SU-8 で形成した微小容器内に粉末状の KCl を満たし、最後に液絡とパッド部を除く全域にシリコーンゴムのパッシベーションを形成した。また、上記の区画の末端に 1mm 程度の切れ込みを入れ、外部液絡とした。微小参照電極の活性化は、使用する直前にマイクロシリンジを用いて、シリコーンゴムのパッシベーションを通し、KCl 電解質層内部へ飽和 KCl/AgCl 溶液を導入することにより行った。

〈2・2〉 Ca^{2+} イオン電極の構造と作製

図 1 (b) に Ca^{2+} イオン電極の構造を示す。イオン感応膜を形成し、内部電解液を貯留するための微小容器をシリコンの異方性エッチングにより形成し、これを前述の銀/塩化銀を形成したガラス基板と貼り合わせた。この微小容器のパッド側の端には内部電解液導入用の貫通孔を形成した。微小容器のサイズは長さ 11.4 mm、幅 1.5 mm、深さ 190 μm である。この電極で用いた Ca^{2+} イオン感応膜の組成を表 1 に示す。イオノフォアとしては ETH129 (Fluka 製) を、担体には PVC

を使用した。イオン感応膜の形成にあたり、犠牲層として 10 % polyvinyl alcohol (PVA) を感応部の裏面から塗布し、30 分間室温で乾燥した。その後、銀/塩化銀を形成したガラス基板と接着し、チップ側面にシリコンゴムの保護膜を塗布した後、感応部にイオン感応膜を形成した。

電解液の微小容器への導入は、チップを電解液の入ったビーカーに浸漬し、脱気操作を施すことにより行った。また、遠心分離により感応部の気泡を除去した。さらに使用に際し、プレコンディショニングを 0.1 M CaCl_2 水溶液中で 24 時間以上行った。

液絡付き微小参照電極と微小 Ca^{2+} イオン電極の裏面を光硬化性接着剤（アーデル製、BENEFIX PC）を用いて接着し、ワンチップ Ca^{2+} イオンセンサを完成させた。

〈2・3〉 特性評価 薄膜状銀/塩化銀電位の飽和 KCl 中での変動、液絡付き微小参照電極電位の 50 mM リン酸緩衝液中での変動は、エレクトロメータ（北斗電工製、HE-106）により調べた。この場合の電位基準としては、市販の銀/塩化銀電極（堀場製作所製、#2080A-06T）を使用した。

イオン電極の電位測定は、市販の参照電極あるいは作製した微小参照電極を使用し、エレクトロメータにより行った。応答曲線、検量線を求めるにあたり、 CaCl_2 微粉末をバックグラウンド溶液中に添加し、 Ca^{2+} 濃度を段階的に変化させた。

3. 結果と考察

〈3.1〉 飽和 KCl 中での薄膜状銀/塩化銀構造の耐久性 図 2 (a) に飽和 KCl/AgCl 中での薄膜状銀/塩化銀の電位の継時変化を示す。図中の％は、銀層中塩化銀の占める割合を示す。銀薄膜表面を単純に塩化銀に変えた従来型構造は耐久性に極めて乏しく、本研究で用いたものと同じ厚さの銀層を用いたものでは、飽和 KCl/AgCl 中で数分程度しか機能しない⁽⁹⁾。銀層をポリイミド層で保護し、中央部のスリットから塩化銀を形成することにより、塩化銀層の溶解が効果的に抑制され、銀層の 80 % を塩化銀に変えた場合には 30 時間以上銀/塩化銀として期待される電位

図 2 薄膜状銀/塩化銀電位の飽和 KCl 中での電位変化
Fig.2. Variation of the potential of the thin-film Ag/AgCl element in saturated KCl/AgCl solution. (a):with the slit directly exposed to the solution, (b):with ENT-2000 filled in the slit. The numerals in the figures indicate the time required to grow AgCl . The percentages in the figure indicate the amount of AgCl grown in the silver thin-film.

を維持することができた。図 2 (b) は上記の構造でさらにスリット部を ENT-2000 層で保護した場合の結果である。スリット構造のみの参照電極に比べ、約 2 倍の 80 時間安定な電位を維持した後、大きな電位変化を伴って破損した。これは ENT-2000 により、塩化銀の溶解がさらに効果的に抑制されたためと考えられる。ENT-2000 層のあるなしにかかわらず参照電極としての寿命が尽きたときには、ガラス基板上の薄膜状の銀/塩化銀は溶液内にすべて溶解しており、実際にこれが耐久性に影響していることが示唆された。

銀基板上に塩化銀層を形成する場合、厚みが $2 \mu\text{m}$ 以下の場合には塩化銀層は一樣には形成されない^{(2),(10)}。従来型構造ではもちろんであるが、新型構造でも、大部分は塩化銀層が占めているにしても、銀と塩化銀の界面付近では、銀そのもの、あるいは非常に薄い塩化銀層の形成された部分が残っているものと思われる。ここでは銀/塩化銀以外の反応が進行する可能性があり、電極電位はこのような反応も含む一種の混成電位になっているものと思われる。混成電位は幾つかの反応（特に交換電流密度の小さい反応）が電極上で進行する可能性がある時に、部分電流の総和が 0 であるという条件下

表 1 Ca^{2+} イオン感応膜の組成

Table 1. Component of the Ca^{2+} ion-selective membrane

Matrix	PVC	32.0 wt%
Ionophore	ETH129	1.0 wt%
Plasticizer	DOA* ¹	66.0 wt%
Lipophilic additive	KTpCIPB* ²	1.0 wt%

*1 Bis (2-ethylhexyl) adipate

*2 Potassium tetrakis (4-chlorophenyl) borate

図3 ダブルジャンクション型銀/塩化銀参照電極電位の経時変化

Fig.3. Variation of the potential of the double-junction reference electrode in 50 mM KH_2PO_4 -NaOH buffer solution containing 0.1 M KCl (pH 7.0).

での開放端電位であり、平衡電位とは異なる^{(11),(12)}。銀/塩化銀に関わる交換電流密度が非常に大きいため、塩化銀が十分に存在する時には、電極電位は銀/塩化銀の平衡電位に非常に近いところに来る。しかし、塩化銀層の溶解、剥離が徐々に進行し、銀と接触している塩化銀が減少してくると、次第に銀/塩化銀の反応の寄与が小さくなり、図2のようにゆるやかに電位が負の方向にドリフトするものと考えられる。そして、最終的に銀/塩化銀の反応の寄与が顕著に小さくなると、大きな電位のシフトを伴って破損するものと思われる。

(3.2) ダブルジャンクション型微小銀/塩化銀型参照電極の安定性 この参照電極はダブルジャンクション型であり、2つの液絡の間の区画が外部液で満たされ、安定化するまでに多少の時間を要する。図3に内部電解質層に飽和 KCl/AgCl 溶液を注入して活性化した後、外部液絡部を 0.1 M KCl を含む 50 mM KH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 7.0) に浸漬した時の、ダブルジャンクション型微小参照電極の電位変化を示す。実験開始から 30 分程度は外部区画に十分に電解液が入っていないことに由来すると見られる大きな液間電位が認められた。実験開始 8 時間後には +10 mV に落ち着き、その後、+5 mV から +10 mV の間の電位を 70 時間程度維持し、最後には急激な電位の上昇を伴い、寿命が尽きた。この電位上昇は内部 KCl の希釈に伴う銀/塩化銀の Nernst 応答である。実際、寿命が尽きた時点では、析出していた KCl がすべて溶出していた。上に述べた 10 mV 程度の液間電位差はできる限り小さくするのが好ましいが、これは寿命との兼ね合いで、今後用途に応じて最適化が必要である。

(3.3) ワンチップ Ca^{2+} イオンセンサの応答特性 ダブルジャンクション型微小参照電極と一体化したワン

図4 ワンチップ Ca^{2+} イオンセンサの応答曲線
Fig.4. Response curve of the one-chip Ca^{2+} ion-sensor to step-changes of Ca^{2+} concentration. Concentration of Ca^{2+} ion was 0.1 mM at the start of the experiment.

図5 ワンチップ Ca^{2+} イオンセンサの検量線
Fig.5. Calibration curve for the one-chip Ca^{2+} sensor. The measurements were made in triplicate for each value of activity. Averages are plotted along with the minimum and maximum of the three values obtained.

チップ Ca^{2+} イオンセンサの応答曲線を図4に示す。微小参照電極の電位が安定化した後に測定を開始した。微小であるにもかかわらず、安定で明瞭な応答が認められた。約4分間隔で CaCl_2 微粉末を添加すると、電位上昇が認められ、その後、すみやかに安定した電位に落ち着いた。応答時間は、攪拌に要する時間を考慮しても 40 秒以内であった。応答曲線にオーバーシュートが認められることもあったが、これは標準液添加、攪拌時に、感応部付近の Ca^{2+} 活量が一時的かつ局所的に増加したことが原因と考えられる。

図5にはワンチップ Ca^{2+} イオンセンサの検量線を示す。ここで、横軸は活量としたが、これは活量係数 γ_i 、 m_i は重量モル濃度と、

$$a_i = f_i m_i / m^\circ \quad \dots\dots\dots(1)$$

の関係にある。添字 i はここでは一般的にイオンを識別するために用いている。ここで、 $m^\circ = 1 \text{ mol kg}^{-1}$ である。活量係数 γ_i は Debye-Hückel の式

$$\log \gamma_i = -\frac{Az_i^2 \sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad \dots\dots\dots(2)$$

より求めた。ここで、 z_i はイオン i の価数、 I はイオン強度、 a はイオンサイズパラメータ、 A 、 B は定数である。

イオン電極の電位は、活量 10^{-4} 以上の範囲で活量の対数に比例しており、Nernst の式あるいは Nicolsky-Eisenman の式

$$E = E^\circ + \frac{RT}{z_i F} \ln(a_i + \sum K_{ij} a_j^{z_i/z_j}) \quad \dots\dots\dots(3)$$

に従っていることが認められる。ここで、 a_i 、 a_j はそれぞれの測定対象イオンと妨害イオンの活量、 K_{ij} は選択係数であり、その他の定数、変数は通常使われるものである。

従来型のイオン電極でこの微小イオン電極と同様のイオノフォアを用いたものでは、28.1 mV/decade の感度が報告されている。今回作製した微小イオン電極では、30.3 mV/decade となっており、これに近い値が得られている。また、血液分析において問題となる範囲をカバーしており、実用的にも問題ないことが示された。低活量側で電位が Ca^{2+} イオン活量に依存しなくなっているが、これはイオン電極に一般的に認められる傾向である。この原因としては、(1) 感応膜からの Ca^{2+} イオンの流出による界面付近での局所的な Ca^{2+} イオンの変動、(2) 妨害物質による影響、が考えられる⁽¹³⁾。

Ca^{2+} イオン電極の選択性を図 6 に示す。異種単独電解質溶液法⁽¹⁴⁾を用い、代表的な妨害イオンによる影響を調べた。

図 6 妨害イオンに対する選択係数 K_{ij}
Fig.6 Selectivity coefficients K_{ij} to possible interfering ions

ここで、活量 a_i の測定対象イオン i (ここでは Ca^{2+} イオン) と、活量 a_j のある妨害イオン j のみを含む溶液を別々に用意し、それぞれの溶液中での Ca^{2+} 電極の電位を E_A 、 E_B とする。この時の Nicolsky-Eisenman の式は、それぞれ

$$E_A = E^\circ + \frac{RT}{z_i F} \ln a_i \quad \dots\dots\dots(4)$$

$$E_B = E^\circ + \frac{RT}{z_i F} \ln(K_{ij} a_j^{z_i/z_j}) \quad \dots\dots\dots(5)$$

となるので、定数項を消去すれば、選択係数 K_{ij} を求める式は次式のようになる。

$$\ln K_{ij} = -\frac{z_i F}{RT} (E_A - E_B) + \ln a_i - \frac{z_i}{z_j} \ln a_j \quad \dots\dots(6)$$

本イオン電極で用いた Ca^{2+} イオン感応膜は、特に K^{+} に対する応答が大きく、これまで報告されている Ca^{2+} イオン感応膜に匹敵する選択性は今回の研究では得られなかった。選択性は、ここで問題となる各イオンの溶媒和エネルギーの差やイオンとイオノフォアの錯形成反応の安定度定数により決まるが⁽¹⁵⁾、必然的に膜組成に依存して大きく変わる。今後はこの点についても最適化を行ってゆきたい。

4. む す び

マイクロマシーニング技術を用いてワンチップ Ca^{2+} イオンセンサを作製した。これを実現する上での一つの課題は、ダブルジャンクション型参照電極の微小化であった。ポリイミド保護膜の中央のスリットから塩化銀を形成し、さらに ENT-2000 層を形成した新型構造を用いることにより、期待される電位を約 80 時間維持できる銀/塩化銀電極が得られた。さらに、厚膜レジストによる内部電解液貯蔵容器とダブルジャンクションを形成することで従来型の参照電極と同様の構造・機能を実現することができた。これにより内部電解液のサンプル溶液への流出・混入を抑制することができた。この微小参照電極を用いて作製されたワンチップ Ca^{2+} イオンセンサの応答は、安定かつ明瞭であった。活量 10^{-4} 以上の範囲で直線的な検量線が得られ、その感度は 30.3 mV/decade であった。本研究では Ca^{2+} イオンセンサを作製したが、このワンチップイオンセンサの構造は一般的で、他のイオンセンサにも適用できる。

(平成 12 年 12 月 19 日受付)

文 献

- (1) J. Janata: "Principles of Chemical Sensors", Plenum Press, New York, 1989, pp.102-107.
- (2) T. Katan, S. Szpak, D.N. Bennion: "Silver/Silver Chloride Electrode: Reaction Paths on Discharge", *J. Electrochem. Soc.*, **120**, 883-888 (1973)
- (3) S. Ito, H. Hachiya, K. Baba, Y. Asano, H. Wada: "Improvement of the Silver/Silver Chloride Reference

- Electrode and its Application to pH Measurement", **42**, 1685-1690 (1995)
- (4) F. Keplinger, R. Glatz: "Thin-Film Ion-Selective Sensor Based on Neutral Carrier Membranes", *Sensors and Actuators*, **B1**, 272-274 (1990)
 - (5) A. Uhlig, E. Lindner, C. Teutloff, U. Schnakenberg, R. Hintsche: "Miniaturized Ion-Selective Chip Electrode for Sensor Application", *Anal.Chem.*, **69**, 4032-4038 (1997)
 - (6) K.L. Rho, S.H. Han, H. Nam, G.S. Cha, K.I. Joung, Y.W. Kim, K.J. Paeng: "Comparative Studies on Various Room-Temperature Vulcanizing-Type Silicone Rubbers as Ion-Selective Electrode Matrices", *Anal.Sci.*, **13**, 969-974 (1997)
 - (7) P.W. Alexander, T. Dimitrakopoulos, D.B. Hibbert: "A Photo-Cured Coated-Wire Calcium Ion Selective Electrode for Use in Flow Injection Potentiometry", *Talanta*, **44**, 1397-1405 (1997)
 - (8) L.T.D. Benedetto, T. Dimitrakopoulos, J.R. Farrell, P.J. Iles: "Evaluation of Perchlorate Tolerant Photo-Cured Calcium Selective Electrodes for Use in Flow Injection Potentiometry", *Talanta*, **44**, 349-356 (1997)
 - (9) H. Suzuki, H. Shiroishi: "Microfabricated Liquid Junction Ag/AgCl Reference Electrode and its Application to a One-Chip Potentiometric Sensor", *Anal.Chem.*, **71**, 5069-5075 (1999)
 - (10) C. Harzdorf: "The Response of Halide Ion-Selective Electrodes to Redox Systems", *Anal.Chim.Acta*, **136**, 61-67 (1982)
 - (11) P.B. Harn, D.C. Johnson, M.A. Wechter, A.F. Voigt: "Mixed-Potential Mechanism for the Potentiometric Response of the Sodium Tungsten Bronze Electrode to Dissolved Oxygen and in Chelometric Titrations", *Anal.Chem.*, **46**, 553-558 (1974)
 - (12) R.K. Meruva, M.E. Meyerhoff: "Mixed Potential Response Mechanism of Cobalt Electrodes toward Inorganic Phosphate", *Anal.Chem.*, **68**, 2022-2026 (1996)
 - (13) E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch: "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics", *Chem.Rev.*, **97**, 3083-3132 (1997)
 - (14) IUPAC Recommendations 1994: "Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes", *Pure & Appl. Chem.*, **66**, 2527-2536 (1994)
 - (15) E. Bakker, R.K. Meruva, E. Pretsch, M.E. Meyerhoff: "Selectivity of Polymer Membrane-Based Ion-Selective Electrodes: Self-Consistent Model Describing the Potentiometric Response in Mixed Ion Solutions of Different Charge", *Anal.Chem.*, **66**, 3021-3030 (1994)

田浦 巧

(非会員) 1977年10月22日生まれ。2000年筑波大学第三学群基礎工学類(物質・分子工学専攻)卒業。同年、筑波大学数理物質科学研究科博士課程(物性・分子工学専攻)入学、現在に至る。マイクロ化学センサ、BioMEMSの研究に従事。

鈴木 博章

(正員) 1958年7月1日生まれ。1981年東京大学工学部卒。1983年東京大学大学院工学系研究科修士課程修了。1983年(株)富士通研究所研究員。1993年博士(工学)(東京大学)。1996年筑波大学物質工学系助教授。現在に至る。マイクロマシーニング、マイクロ化学センサ、マイクロバイオセンサ、BioMEMSなどの研究に従事。