

総合論文

植物栄養成分センサの開発

白井 理^{*1}, 宋和 慶盛¹, 北隅 優希¹

穀物や野菜の栽培においては、植物が必要とする三要素（窒素、リン、カリウム）のバランスのよい施肥が必要不可欠である。また、農地土壌や水耕栽培の培養液の pH も植物の生育に大きな影響を及ぼす。三要素の窒素は、硝酸イオン、亜硝酸イオン、アンモニウムイオンとして環境中で存在するが、とくに硝酸イオンは植物の成長に深く関係し、簡単にその場でできる硝酸イオン濃度の測定法が求められている。イオン選択性電極（ISE）による定量法は、前処理を必要とせず、簡単で持ち運びも容易であり、有力な候補である。しかし、従来の硝酸イオン ISE の応答挙動が不安定であることからほとんど利用されてこなかった。著者らは、共存する塩化物イオンの影響をできるだけなくすことで、1 か月程度のモニタリングに使用できる ISE の開発に成功した。また、リン酸イオンは中性領域で酸解離反応があり、 H_2PO_4^- と HPO_4^{2-} が共存するため、pH とともに評価する必要がある。リン酸イオン ISE は、応答挙動が複雑で安定性に欠けるため、実用化されていなかった。著者らは、溶存酸素濃度を一定にすることにより、コバルト修飾電極を用いて再現性よく H_2PO_4^- を定量できることを見いだした。また、リン酸に限らず他の微量成分の存在形態は pH に依存し、pH も植物栽培において重要であることから、ガラス電極に代わる新規 pH センサの開発も試みた。さらに、硝酸イオン ISE とリン酸イオン ISE とともに既報のカリウムイオン ISE を組み合わせることで水耕栽培の培養液中の栄養成分濃度を自動制御する簡易システムを構築した。

1 はじめに

穀物や野菜などの植物の栽培においては、植物が必要とする三要素（窒素、リン、カリウム）のバランスのよい施肥が必要不可欠である^{1)~3)}。また、 H^+ はそれ自体が植物体内への取込みに影響するが、各種のイオンや化合物の溶存状態を変化させるため、農地土壌や水耕栽培の培養液の pH も植物の生育に大きな影響を及ぼす。現在、過剰な施肥により、農地だけでなく周辺の環境水の富栄養化が大きな環境問題となっている⁴⁾⁵⁾。さらに、植物体内に過剰な栄養成分が残留する場合については健康問題も懸念されている⁶⁾。必要な栄養成分を状況に応じて与えることが栽培期間の短縮化、農産物の増産・高品質化につながると期待され、各栄養成分濃度の測定とその濃度の最適化が試みられている⁷⁾。とくに、硝酸イオン (NO_3^-) は植物の成長に最も深く関係し⁸⁾、培養液や土壌から吸収されるため、簡単にその場で測定できる NO_3^- 濃度の定量法が求められている。分光法やイオンクロマトグラフでは採取した試料のろ過等の前処理が必要であり、持ち運びも困難である⁹⁾¹⁰⁾。電気伝導度やイオン選択性電極 (ISE) による定量法は、前処理を必要とせず、簡単で持ち運びも容易であることから

有力な候補となる¹¹⁾¹²⁾。しかし、前者は他の成分と分別することができず、総イオン濃度の目安となるだけで NO_3^- 濃度を正確に測定することはできない。後者は、再現性が乏しいことや使用中における測定値の変動が問題となり、あまり利用されていない。著者らは、従来の NO_3^- -ISE の問題は内部溶液に添加した塩化物イオン (Cl^-) や参照電極から流出する Cl^- の影響で生じていることを見だし、改良を行った¹³⁾¹⁴⁾。また、リン酸イオン (Pi) 定量用の化学センサについては、報告例はあるものの安定性・再現性に欠けるため、実用化されていない^{15)~17)}。なお、Pi の存在形態は土壌や培養液の pH に依存して変動する。Pi の酸解離定数は 2.15, 7.20, 12.35 であるので、植物の生育環境である弱酸性から弱アルカリ性の領域 (pH 4~9 付近) では H_2PO_4^- あるいは HPO_4^{2-} として存在する。したがって、 H_2PO_4^- あるいは HPO_4^{2-} に感応する ISE の開発が求められている。そこで、再現性に乏しい原因を解明し、改良することで安定に測定できる Pi-ISE を報告した¹⁸⁾。カリウムイオン (K^+) については、イオノフォアとしてバリノマイシン等を用いた有機液膜型感応膜を利用した ISE が一般的に利用されている¹⁹⁾。これらの三要素以外にも必須とする微量元素は 10 種類以上存在するが、極めて低濃度であるため現時点では制御は困難である。また、Pi だけでなく、これらの微量元素の溶存状態は主に pH に依存するため²⁰⁾、pH も植物の栽培には重要な指標となる。pH 測定において

* E-mail: shirai.osamu.3x@kyoto-u.ac.jp

¹ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻: 606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

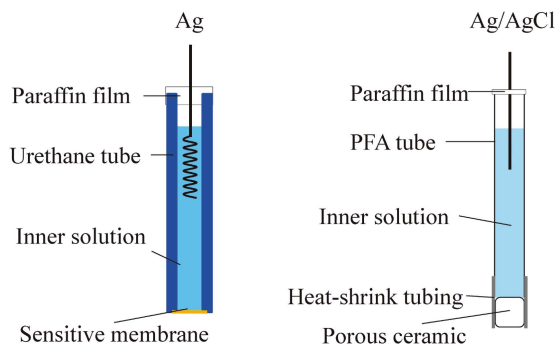


Fig. 1 Structure of ISE (left) and RE (right)

は、ガラス電極は取扱いが容易であり、安価で安定的に使用できるため、最も普及している。しかし、長期間使用時のガラス表面へのバイオフィルムの付着なども課題となっている。また、食品や医薬品の品質管理や生体内での直接測定を行う場合は、ガラス膜が破損しやすいことと小型化が困難であることから他の電極系の開発が望まれている。

近年、ロボット、AI、IoT等の先端技術を活用して、超省力で高品質な生産を可能とするスマート農業が注目されている⁽²¹⁾⁽²²⁾。農業の自動化を図り、効率のよい農業を目指している。とくに水耕栽培においては、水量、温度、光量などの培養条件だけでなく、栄養成分のコントロールにより生育の促進及び作物の高品質化が求められている。その際、 NO_3^- 、 H_2PO_4^- あるいは HPO_4^{2-} と K^+ の濃度とpHの自動制御システムの構築が検討されている^{(23)~(25)}。そこで、著者らは、自作の NO_3^- -ISE、 H_2PO_4^- -ISE、及び K^+ -ISEを用いて、コンピューター制御及びポンプを用いない簡易型の栄養成分自動制御システムを構築した⁽²⁶⁾。

本稿では、新規開発してきた NO_3^- -ISE、 H_2PO_4^- -ISE、 HPO_4^{2-} -ISE及びPd電極を用いたpHセンサについて、作製法とともに応答機構などの基礎特性について解説する。さらに、それらのセンサを利用した簡易型栄養成分自動制御システムについても紹介する。

2 硝酸イオン選択性電極の開発とその応答特性

2.1 硝酸イオンセンサの構築

ISEを用いたポテンシオメトリーでは、参照電極(RE)とISE間の電位差から試料溶液中の対象イオンの活量 a を評価する。以下、 NO_3^- を対象イオンの例として用い、この原理について述べる。まず、水溶液(W)と有機溶媒(O)間の電位差は式(1)で表される⁽²⁷⁾。

$$E = E^\circ + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_W}{a_O} \quad (1)$$

ここで、 E はガルバニ電位差、 E° は標準ガルバニ電位差、 R は気体定数、 T は絶対温度、 z は反応電子数、 F はファラ

デー定数、 a_W と a_O はそれぞれ水溶液中及び有機溶媒中の NO_3^- の活量である。

NO_3^- -ISEと外部参照電極(RE)は試料溶液(W_s)中に挿入して使用する(Fig. 1)。以下には、内部溶液中の電極として銀線を用い、 $\text{Ag}|\text{Ag}^+$ 対を利用した系における構成の一例を示す。従来は、内部溶液に NO_3^- とともに Cl^- を添加し、 $\text{Ag}|\text{AgCl}$ 電極が内部溶液中の電極として使用されていた。しかし、 NO_3^- -ISEでは Cl^- に対する選択係数が100程度であるので NO_3^- 濃度が $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (M)以下の低濃度領域では妨害の影響が現れると考え、 $\text{Ag}|\text{AgCl}$ 電極の代わりに $\text{Ag}|\text{Ag}^+$ 電極系を使用した⁽¹⁴⁾。

内部銀電極	内部溶液 (W_i)	液膜 (LM)	試料溶液 (W_s)	外部参照電極
Ag	50 mM AgNO ₃ 50 mM Mg(NO ₃) ₂	約 5 mM THpA ⁺ NO ₃ ⁻ 溶媒: NPOE	a_{W_s} M M ⁺ NO ₃ ⁻	RE

なお、「内部銀電極」から「液膜」までが NO_3^- -ISEを構成している。ここでは、液膜として、*o*-nitrophenyl octyl ether (NPOE) 溶液を用い、NPOE溶液を含浸させたポリ塩化ビニル (PVC) 膜を構造材として使用した。液膜内に NO_3^- を安定化させるために、対イオンとして疎水性のtetraheptylammonium (THpA⁺)を用いた。また、外部の参照電極REは電極内部溶液と $\text{Ag}|\text{AgCl}$ 電極で構成されており、その組成の一例を以下に示す。

試料溶液 (W_s)	RE 内部溶液	参照電極
a_{W_s} M M ⁺ NO ₃ ⁻	50 mM MgCl ₂ 2 M MgSO ₄	Ag AgCl 電極

ここで、二重線で示した部分が液絡であり、以下のように各相間の電位差を定義する。REと W_s 間の電位差を E_{OR} 、 W_s とLM間の電位差を E_{W_s-LM} 、LMと W_i 間の電位差を E_{LM-W_i} 、 W_i と内部銀電極間の電位差を E_{IR} 、そして外部参照電極(RE)と内部銀電極間の電位差を E_{ISE} とする。二電極間の電位差は E_{ISE} である。界面電位差 E_{W_s-LM} 及び E_{LM-W_i} は W_s 、LM及び W_i における NO_3^- の活量と NO_3^- の水|NPOE間の標準イオン移動電位によって決まる。液膜内の有機溶媒相(以下「有機相」とする)、内部溶液相、外部溶液相の NO_3^- 活量をそれぞれ a_{LM} 、 a_{W_i} ($=a_1+2a_2$)、 a_{W_s} とすると、界面電位差 E_{W_s-LM} 、 E_{LM-W_i} は次式で表現される。

$$E_{W_s-LM} = -E^\circ + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{LM}}{a_{W_s}} \quad (2)$$

$$E_{LM-W_i} = E^\circ - \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{LM}}{a_{W_i}} \quad (3)$$

ここで、 E° は NO_3^- の水相|NPOE界面での標準イオン移

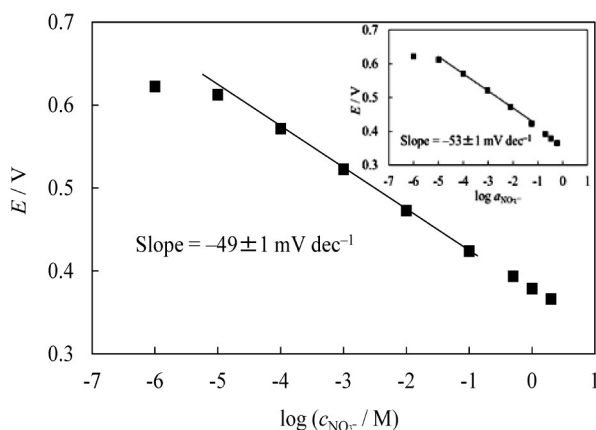


Fig. 2 Potential response of a NO_3^- -ISE to $\log(c_{\text{NO}_3^-}/\text{M})$ Inset, potential response of a NO_3^- -ISE to $\log(a_{\text{NO}_3^-}/\text{M})$

動電位を示す。外部参照電極 (RE) を基準とすると, RE と ISE 間の電位差 E_{ISE} は式 (4) で表現される。

$$E_{\text{ISE}} = E_{\text{IR}} + E_{\text{LM-WI}} + E_{\text{WS-LM}} + E_{\text{OR}} \quad (4)$$

ここで, ISE の内部溶液の Ag^+ の活量は一定であるため E_{IR} も一定であること, 高濃度の MgSO_4 を RE 内部に含んでいるため RE 内部と試料溶液の液間電位である E_{OR} も一定となることを考慮すると, 式 (5) は

$$\begin{aligned} E_{\text{ISE}} &= E_{\text{IR}} + E_{\text{OR}} + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{WI}}}{a_{\text{WS}}} \\ &= -2.303 \frac{RT}{F} \log a_{\text{WS}} + \text{const.} \end{aligned} \quad (5)$$

と書き換えられる。すなわち, E_{ISE} は試料溶液中の NO_3^- 活量によって決まることがわかる。標準状態においては $-2.303RT/F = -59 \text{ (mV dec}^{-1}\text{)}$ であるため, 活量が 10 倍になると, 約 59 mV だけ負の値を示すことを意味している。ゼロ電流電位 (静止電位) は系内の全イオン種の複雑な相互作用によって決定される。従来, ISE 電位は拡散電位に基づく Nikolsky-Eisenman 式で表現され,

$$E = E_i^\circ + \frac{2.303RT}{z_i F} \log \left\{ a_i + \sum_{j \neq i} k_{ij}^{\text{pot}} (a_j)^{z_i/z_j} \right\} \quad (6)$$

で表される²⁸⁾。測定対象となるイオン i (電荷: z_i) とその妨害イオン j (電荷: z_j , 正負は i と一致) についての関係式である。したがって, 共存イオンの妨害特性は, 選択係数 k_{ij}^{pot} で表現される。

以上のように, ゼロ電流電位は感応膜に接する水相に共存するアニオン及びカチオンの影響を受ける。理論的には試料溶液中の目的イオンの活量に Nernst 応答 (59 mV

dec^{-1}) するが, 実際の測定では活量ではなく濃度に対して検量線を作成することが多い。また, その場合は 59 mV dec^{-1} より小さな傾きを示す。また, 感応膜中の NO_3^- の活量が減少しないように, 内部水溶液には十分量の $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ を添加した。一般的には RE として $\text{Ag}|\text{AgCl}$ 電極と飽和 KCl 水溶液がしばしば用いられるが, 長期間の測定では試料溶液中に漏れ出ることにより感応膜に悪影響を及ぼす可能性が高い。したがって, 高濃度の KCl の使用を避けるため, 内部溶液としては 50 mM MgCl_2 と 2 M MgSO_4 を含む水溶液を用いた。このようにして, $\text{Ag}|\text{AgCl}$ と内部溶液間の電位差は Cl^- 濃度によって規定されるようにし, 高濃度の MgSO_4 を添加して液絡部分の液間電位差を規定するようにした。以上のように, NO_3^- -ISE の電位差は NO_3^- 活量のみ関数として表されるようにイオン組成を調整した。

なお, 後述の栄養成分濃度自動制御システムで使用する K^+ イオンセンサの場合は, K^+ 感応膜 (LM) としてテトラキス[3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]ホウ酸カリウム (KTFPB) とイオノフォアであるバリノマイシン及び α -NPOE を含む PVC 薄膜を用いた。ISE 電極の内部溶液には 1 M KCl を用い, $\text{Ag}|\text{AgCl}$ 電極を内部電極に使用した。

2.2 硝酸イオンセンサの応答特性

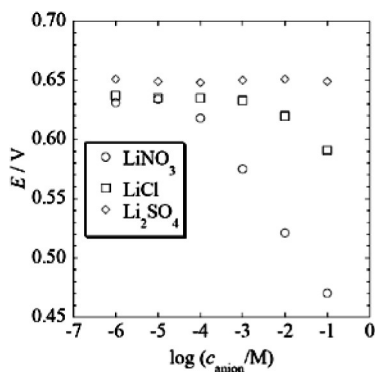
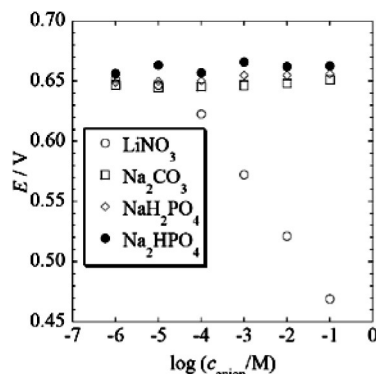
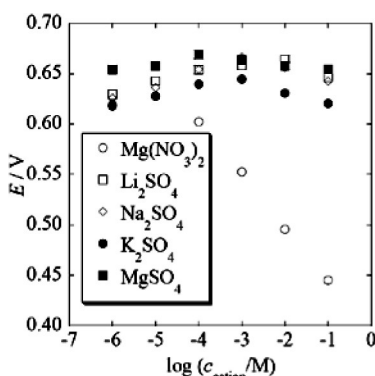
NO_3^- -ISE の NO_3^- 濃度に対する応答を確認するため, 2.1 に記載したセル系で電気化学測定を行った。RE に対する NO_3^- -ISE の電位 (E) を $5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ から 1 M までの $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 水溶液について, エレクトロメーターで測定した。一溶液あたり 120 秒間測定し, 60 秒から 120 秒までの電位の平均値を記録した。測定温度は 25°C であった。Fig. 2 のように, 10^{-5} M から 2 M までの NO_3^- 濃度の領域において, NO_3^- 濃度の常用対数に対して ISE の電位が直線的に応答した。傾きは ISE ごとに多少のばらつきがあるが, 約 -49 mV dec^{-1} であった。得られた E は式 (7) で表された。

$$E = (0.367 \pm 0.0001) - (0.049 \pm 0.001) \log(c_{\text{NO}_3^-}/\text{M}) \quad (7)$$

ISE は実際には濃度ではなく活量に応答するので, それぞれの溶液における NO_3^- の活量の常用対数に対して ISE 電位は傾き約 -53 mV dec^{-1} で直線的に応答した (Fig. 2 挿入図)。ここで, 任意の $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中の NO_3^- 活量 $a_{\text{NO}_3^-}$ は活量定数 γ と $c_{\text{NO}_3^-}$ (各溶液中の NO_3^- 濃度) を用いて,

$$a_{\text{NO}_3^-} = \gamma c_{\text{NO}_3^-} \quad (8)$$

と表される。なお, この γ は Debye-Hückel 則に基づき

Fig. 3 Potential responses of a NO_3^- -ISE for anionsFig. 5 Potential responses of a NO_3^- -ISE for common environmental anionsFig. 4 Potential responses of a NO_3^- -ISE for cations

を調製し、 NO_3^- -ISE の電位応答についての結果を Fig. 3～5 に示す。

Fig. 3 は、非常に親水的な Li^+ をカチオンとして使用し、 NO_3^- -ISE に対する NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} の応答を調べたものである。 LiNO_3 に対しては NO_3^- -ISE は正常に応答した。 LiCl に対しては 10^{-3} M 以下では応答しなかったが、 10^{-3} M 以上の高濃度条件下では応答した。したがって、Nikolsky-Eisenman 式に基づき、 $k_{ij}^{\text{pot}} = 10^{-2.0}$ と評価した ($i = \text{NO}_3^-$, $j = \text{Cl}^-$)。また、親水的な Li_2SO_4 に対しては 10^{-6} M から 10^{-1} M の濃度範囲では応答せず、妨害の影響はないことがわかった ($k_{ij}^{\text{pot}} < 10^{-4}$)。

Fig. 4 には、親水的なアニオンである SO_4^{2-} を含むさまざまな電解質塩に対する NO_3^- -ISE の電位応答を示す。 Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} に対しては応答しないが、 K^+ に対しては 10^{-2} M 以上では応答することがわかった。したがって、 $k_{ij}^{\text{pot}} = 10^{-3.0}$ 程度と評価した ($i = \text{NO}_3^-$, $j = \text{K}^+$)。通常アニオン選択性電極では共存アニオンしか選択性を評価していないが、液膜型 ISE の特色を考慮すると、このようにカチオンでもある程度疎水性が高い場合は妨害の影響を考慮しなければいけないことがわかる。

Fig. 5 には、 CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- といった自然環境中に存在する主要アニオン類 (カチオンは Na^+) に対する NO_3^- -ISE の電位応答を示す。これらの親水的なアニオンは妨害の影響が現れないことが判明した ($k_{ij}^{\text{pot}} < 10^{-4}$)。

これらに示したイオンのほか、カチオンについては、 NH_4^+ は K^+ と同程度の疎水性を有するため、同程度の妨害を示すと考えられる。また、水和エネルギー及び水相-有機相間移行エネルギーを念頭に置くと、 NO_3^- と同程度かより疎水的なアニオンとして、 IO_4^- , ClO_4^- , BF_4^- , I^- , ClO_3^- , Br^- , BrO_3^- , CN^- , NO_2^- などが挙げられる³⁰⁾³¹⁾。いずれのイオンも環境水及び土壌中にはほとんど存在しないため (例: Br^- は 10^{-6} M オーダー, ClO_4^- は 10^{-8} M オーダー), 考慮する必要はないと思われる。 NO_2^- も通常は影響がないが、 10^{-3} M 以上に存在する場合は影響が現れると

式 (9) で表される²⁹⁾。

$$\log \gamma = \frac{Az_+z_-\sqrt{I}}{1+Bd\sqrt{I}} + bI \quad (9)$$

ここで、 $A = 0.5091 \text{ mol}^{-1/2} (25^\circ\text{C})$, $B = 0.3291 \times 10^8 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1/2} \text{ kg}^{1/2}$, $d = 4.0 \times 10^{-8} \text{ cm}$ であり、 z_+ (Mg^{2+} の電荷数) = +2, z_- (NO_3^- の電荷数) = -1, $I(\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \text{ 溶液のイオン強度}) = 1.5 \times c_{\text{NO}_3^-}$, $b = 0.055 \text{ mol}^{-1} \text{ kg}$ である。これらによって $a_{\text{NO}_3^-}$ が導き出され、グラフの傾きは $-53 \pm 1 \text{ mV dec}^{-1}$ となり、より理論値に近い値を示した。このように、活量で表現した系のほうがより正確であるが、環境中や水耕栽培では、 NO_3^- と共存するカチオン及びアニオンの影響で活量の評価は困難となる。そのため、以後の ISE の応答については NO_3^- 濃度 ($c_{\text{NO}_3^-}$) で議論した。

2.3 共存イオンの影響

NO_3^- -ISE に対して感応しうる共存イオンについて影響を調べた。 LiNO_3 , LiCl , Li_2SO_4 , Na_2SO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 について、 10^{-6} M から 10^{-1} M の濃度 (Na_2SO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 , Li_2SO_4 に関してはカチオンの濃度、それ以外はアニオンの濃度) の溶液

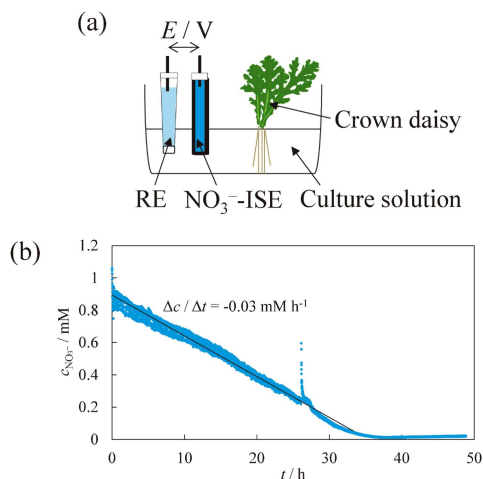


Fig. 6 Schematic overview of a cultivation container (a) and a time-course of $c_{\text{NO}_3^-}$ in the culture solution (b)

考えられる。

2.4 植物の水耕栽培における培養液中の硝酸イオン濃度変化のモニタリング

植物による NO_3^- の吸収を水耕栽培の培養液中の NO_3^- 濃度のモニタリングにより確認した。1 mM の硝酸カリウムを含む水道水 200 mL を入れた培養桶に重さ 5.14 g のシュンギクを Fig. 6 (a) に示すように入れた。根の上部 5 cm 程度が水面上に出るようにし、培養液中に NO_3^- -ISE と参照電極 (RE) を挿入して、 NO_3^- -ISE 電位を記録した。なお、培養容器は人工気象器内に設置し、気温を 25 °C に保ち、光を照射しながら培養を行った。対照実験として、同型の容器に培養液のみを入れたものを用いて比較した。なお、培養前後の植物重量は表面の水分を拭き取ったのちに測定した。Fig. 6 (b) に示すように、 NO_3^- 濃度は実験開始時に 1 mM であったが、時間の経過とともに直線的に減少した。このように、植物が NO_3^- を吸収する様子をモニタリングした。測定前後で硝酸態窒素は吸収され、植物の重量は、5.14 g から 7.68 g へと、2.54 g 増加した。また、培養液の容積は 200 mL から 123 mL へと変化した。蒸発のみが生じる対照実験の場合、200 mL から 188 mL へ変化したので、植物による吸収と蒸散で、培養液の容積は植物がない場合と比較して大きく減少していることがわかった。 NO_3^- の窒素原子 2.8×10^{-3} g すべてが代謝されて、植物体に変化したとすると、窒素重量が全体の重量変化に占める割合は 1.1 % となり、一般的な植物中の窒素原子の割合とほぼ一致した。

3 リン酸イオン選択性電極の開発と応答特性

3.1 リン酸イオンセンサの構築

リン酸イオン選択性電極を用いたセンサは、今のところ

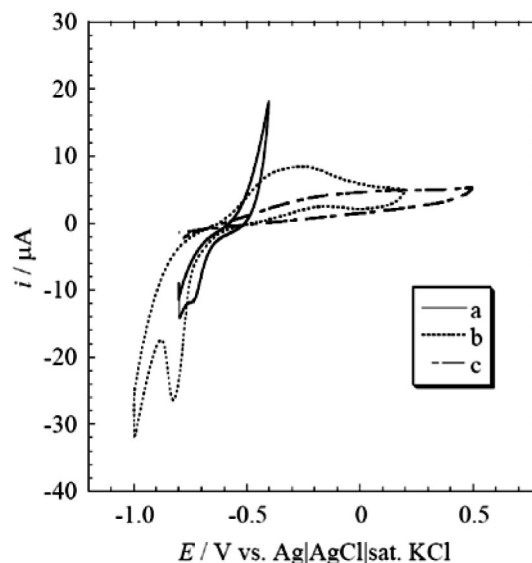
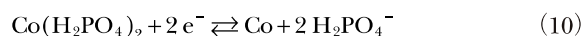


Fig. 7 Cyclic voltammograms of the cobalt electrode in 0.1 M NaH_2PO_4

(a) pH 5, (b) pH 7, (c) pH 9. Potential scanning rate, 50 mV s⁻¹. Electrode area, 0.785 cm².

実用化されておらず、報告例があるのみである^{15)~17)}。ただし、既報のリン酸イオンセンサは、電位応答機構の詳細が解明されておらず、安定性及び再現性に問題があることが知られている。著者らは、 H_2PO_4^- に感応すると報告されているリン酸コバルトを被覆したコバルト電極を用いて、感応機構を明らかにし、測定条件を最適化することで、問題を克服することを試みた。まず、電位応答に溶存酸素濃度が影響することを見いだした。そこで、測定溶液を空気でバブリングし、測定溶液中の溶存酸素濃度を一定にしたところ、 H_2PO_4^- に対して $10^{-5} \sim 10^{-1}$ M の濃度範囲で安定に応答するセンサ電極を作製することに成功した¹⁸⁾。

Fig. 7 には、0.1M NaH_2PO_4 水溶液中におけるコバルト電極を用いた場合のサイクリックボルタモグラムを示す。pH 5 では、-0.6 V あたりから陽極波が立ち上がり、負側ではその逆反応による陰極波が観察された。なお、系に HPO_4^{2-} が存在しない場合はこの陽極波及び陰極波は観測されなかった。pH 7 では、陽極波及び陰極波は小さくなり、pH 9 ではさらに小さくなった。既報に基づき解析した結果、この陽極波は Co の溶解に伴い、表面にリン酸化合物が析出するために生じていることが判明した。 H_2PO_4^- が存在しない場合はこの陽極波は観察されなかったので、ここで観察された酸化還元反応は式(10)と考えられる。



pH が上昇するにつれ、 H_2PO_4^- の減少と $\text{Co}(\text{OH})_2$ の生成により、式(9)に示す反応が抑制されたものと考えられる。

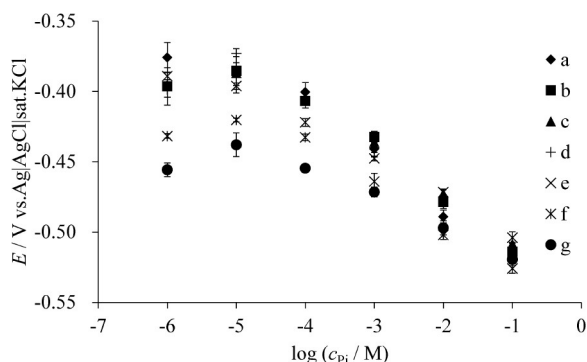
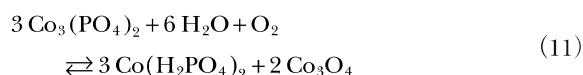


Fig. 8 Potential responses of a H_2PO_4^- -ISE

(a) pH 4.0, (b) pH 5.0, (c) pH 6.0, (d) pH 6.5, (e) pH 7.0, (f) pH 8.0, (g) pH 9.0.

なお、表面の電析物はX線回折により、 $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ であることが判明した。溶液中の酸素を除去すると H_2PO_4^- に感応しなくなるなど、溶存酸素濃度に依存することから、式(11)に示す反応により、電極表面では $\text{Co}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$ 及び Co_3O_4 が共存していると考えた。



3・2 H_2PO_4^- -ISEの応答特性

3・1に記述した特性より、コバルト電極の感応対象イオンは H_2PO_4^- と同定した。そこで、 H_2PO_4^- -ISE用のコバルト修飾電極を作製する際は、 $-0.3\text{ V vs. Ag|AgCl|sat. KCl}$ で2時間酸化して表面にリン酸化合物を析出させた。なお、このようにして作製した H_2PO_4^- -ISEは4週間程度の連続測定で安定して使用できた。Fig. 8には、 H_2PO_4^- -ISEのpH 4.0～9.0における応答特性を示す。pHが4.0～6.5の領域において、 H_2PO_4^- 濃度が $10^{-5} \sim 10^{-1}\text{ M}$ の範囲で濃度の対数に対して直線的に感応した。その傾きは -39 mV dec^{-1} であり、検出限界は 10^{-5} M であった。pH 4.0のときの電位 E は

$$E = (-0.562 \pm 0.001) - (0.039 \pm 0.001) \log(c_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} / \text{M}) \quad (12)$$

と表される。

H_2PO_4^- の酸解離定数が7.2であるので、pH 7.0では若干電位が負側にシフトし、低濃度側でより顕著となった。pHを大きくすると、さらに負側へのシフトが観察された。また、 HCO_3^- 、 NO_3^- 、 CH_3COO^- 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- に対する選択係数は混合溶液法によりそれぞれ -2.1 、 -2.5 、 -3.2 、 -4.0 、 -4.0 と評価した。

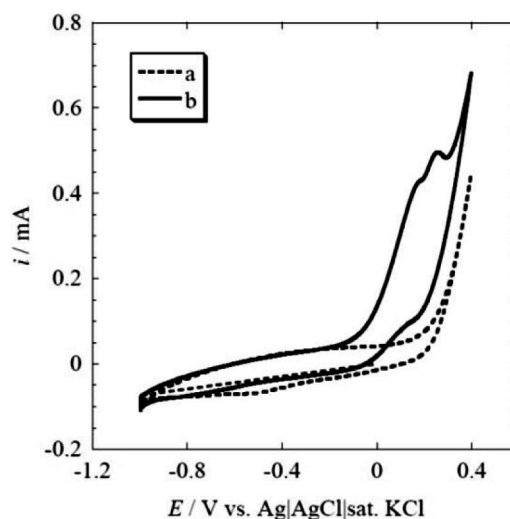
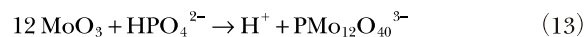


Fig. 9 Cyclic voltammograms of a molybdenum metal electrode at pH 9 in 0.1 M NaCl (a) and 0.1 M Na_2HPO_4 (b). Potential scanning rate, 50 mV s^{-1} . Electrode area, 0.0314 mm^2 .

3・3 HPO_4^{2-} -ISEの構築とその応答特性

コバルト電極を用いた場合、使用に適したpH領域が4.0～6.5であったため、中性からアルカリ側でも使用できる HPO_4^{2-} に感応する電極についても検討したところ、モリブデン電極が使用できることを見いだした³³⁾。Fig. 9は0.1 M NaClあるいは0.1 M Na_2HPO_4 中（ともにpH 9.0）でのモリブデン電極で観察されたサイクリックボルタモグラムの示す。 -0.8 V 辺りから現れる緩やかな陽極波は MoO_2 の生成によるものと考えられる。Fig. 9 (a)では、 0.2 V 辺りから陽極波が観察されたが、これは MoO_4^{2-} の生成によるものと推察される³²⁾。 HPO_4^{2-} 共存時には -0.1 V 付近から陽極波が現れた。 MoO_2 はさらに一部が2電子酸化されて、 MoO_3 が生成されることが考えられるため、式(12)の反応が生じたものと予想される。



この反応により、陽極波が現れたと考えられるが、 0.2 V で定電位電解をしばらく行ったところ、水溶液が黄緑色に変色した。変色した水溶液と0.1 mMの12モリブドリン酸($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \cdot x\text{H}_2\text{O}$)溶液のUV-Visスペクトルの特色がほぼ一致したため、式(13)の反応が生じていることがわかった。また、表面の電析物は、X線回折法によって、Moの酸化物であることを確認した。

HPO_4^{2-} 選択性のMo電極は以下の要領で作製した。直径が $2\text{ mm}\phi$ のMo金属線をテフロンチューブで被覆し、試料溶液との接触部分を 10 mm とした。Mo金属表面を研磨後、0.1 M Na_2HPO_4 (pH 9.0)中に挿入し、 Ag|AgCl|sat. KCl に対して 0.2 V を2時間印加することで調製した。pH

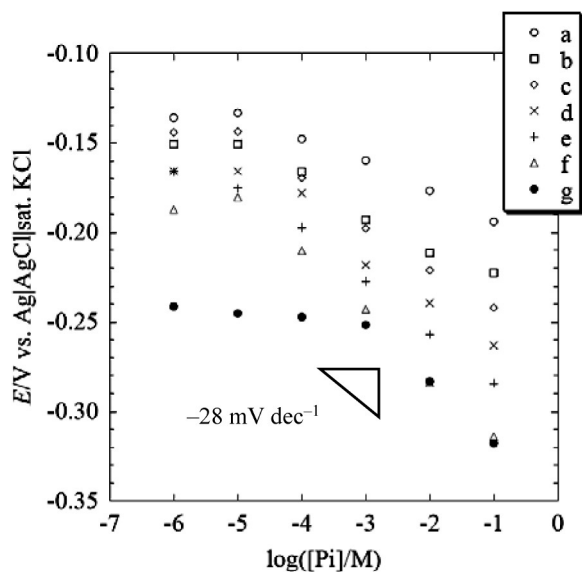


Fig. 10 Potential responses of a HPO_4^{2-} -ISE

(a) pH 7.0, (b) pH 7.5, (c) pH 8.0, (d) pH 8.5, (e) pH 9.0, (f) pH 9.5, (g) pH 10.0.

領域が8.0～9.5で HPO_4^{2-} に応答することを確認した。

このようにしてリン酸化合物を表面に修飾した電極を作製し、リン酸イオンに対する感応特性を調べ、pH、イオン強度、共存する妨害イオンの影響についても評価を行った。

Fig. 10に示すように、本リン酸イオン選択性電極の電位 E はpH 9の場合、リン酸イオン濃度が $10^{-5} \sim 10^{-1}$ Mの領域で濃度の対数に対して直線的に応答し、式(14)の関係が得られた。

$$E = (-0.312 \pm 0.005) - (0.0278 \pm 0.0005) \log(c_{\text{HPO}_4^{2-}} / \text{M}) \quad (14)$$

検出限界は 10^{-5} Mであった。なお、pHの増加に伴い、負電位側にシフトしているのは、 Mo|MoO_2 の電位がpHに依存して負側へシフトするためと考えられる。

pH 8以下の条件では、正側にシフトしたが、これは H_2PO_4^- の存在比が高まるためと考えられる。応答時間は3 min以内であり、 NO_3^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 HCO_3^- 、 CH_3COO^- による妨害は小さく、 $k_{\text{pot}} < -2$ であった。なお、水耕栽培培養液中で1週間の連続測定を行ったのちの電位変動は3 mV未満であり、安定した挙動を示した。このように、pH依存特性を有することから、中性に近い領域ではpHの測定も必要であると考えられる。

4 pH電極の開発と応答特性

4.1 水素吸蔵金属を利用したプロトンセンサの構築

pHの測定は生物、化学、医療、工業などさまざまな領

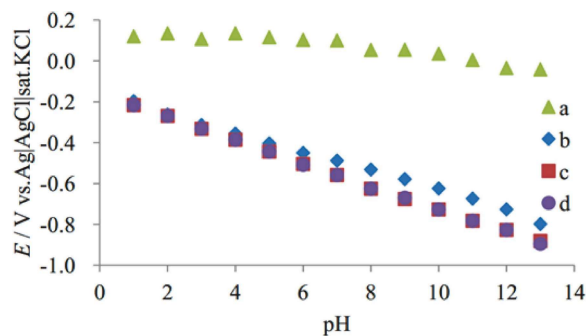


Fig. 11 Relation between the resting potential of a modified palladium electrode and the pH

Coulomb number: (a) 0 C, (b) 0.5 C, (c) 2.5 C, and (d) 5.0 C.

域で必要不可欠とされている。従来は、pH指示薬及びガラス電極によってpHが評価されてきた。なかでもガラス電極は安定で取扱いが容易なので幅広く使用されてきた。しかし、ガラス電極は破損しやすく、電極の微小化が困難であり、アルカリ誤差を避けられないため、これらの課題を克服する水素イオン選択性電極の構築が求められている。そこで、水素吸蔵金属であるPdを基盤電極とし、十分に H_2 を吸蔵させたPd電極を用いることで水素イオン選択性電極の構築を試みた³³⁾。

直径2 mmφ、長さ100 mmのPd棒(99.9%, ニラコ製)の先端部をポリ四弗化エチレンの被覆材(外径10 mmφ、内孔径2 mmφ、長さ20 mm)で覆い、Pd表面を研磨し、純水中で30分間超音波洗浄を行った。その後、0.1 M HCl水溶液中にPd電極を挿入し、 -0.9 V (vs. Ag|AgCl|sat. KCl)で定電位電解を行うことで、発生した H_2 ガスをPd電極に吸蔵させた。このようにして水素を吸蔵したPd電極を作製し、 H^+ に対する感応特性を調べ、電位応答機構についても検討した。Fig. 11に示すように、 H_2 ガス発生に使用された電気量が0.5、2.5及び5.0 Cとなるように電解したところ、どの場合においても H^+ 濃度に感応することが明らかになった。また、 H_2 ガスを吸蔵していない場合は、 H^+ に感応しないこともわかった。吸蔵した H_2 は電極から徐々に放出される。それにより、電極表面近傍では H_2 ガスが1 atmで存在し、安定な $\text{H}_2|\text{H}^+$ 電極として利用できたものと考えられる。 H_2 ガスはPd金属表面全体で放出されるため、電極として使用している部分以外を被覆していないと H_2 ガスが早く流出する。そのため、Pd電極を被覆していない場合は H^+ に対する応答劣化がより早く現れることがわかった。

4.2 プロトンセンサの応答特性

Fig. 11に示すように、本pHセンサはpH 1からpH 13までの領域でpHに対して直線的に応答し、その傾きは

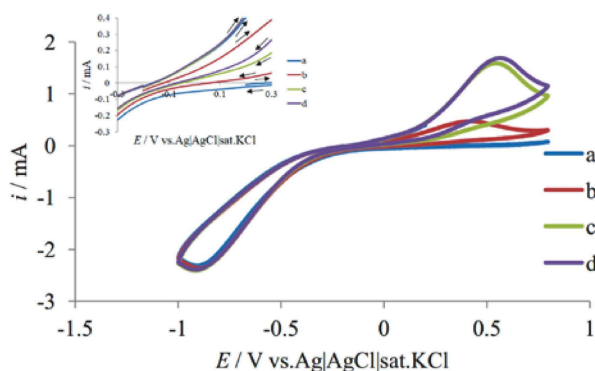


Fig. 12 Cyclic voltammograms of the palladium electrode in 0.1 M HCl

Potential scanning rate, 0.05 V s^{-1} . (a) 1st cycle; (b) 2nd cycle; (c) 3rd cycle; (d) 4th cycle. Inset: enlarged graph of the potential region between -0.3 and 0.1 V .

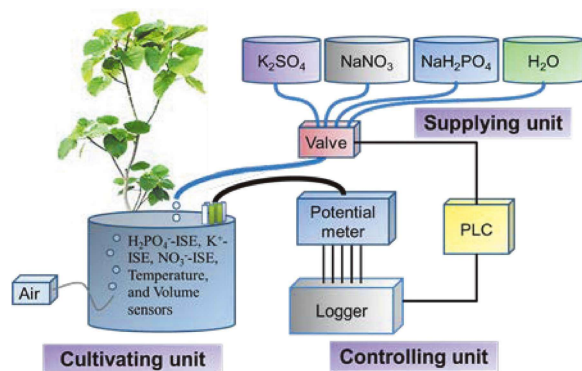


Fig. 13 Outline of an automatic management system for the nutrient concentration within the culture solution

-56 mV pH^{-1} であった。応答時間は5秒以内であった。水素吸蔵合金の安定性を確認するために1か月間の連続測定を行ったところ、電位のずれは5 mV未満であった。次に、塩酸中で酸誤差について検討したところ、塩酸の濃度が3 M以下の場合には応答に影響がみられなかった。ガラス電極と比較しても、大きな差異はみられなかった。アルカリ誤差については、ガラス電極では Li^+ 及び Na^+ の場合に顕著に現れたが、Pd電極では Li^+ についてのみ、1 M以上で影響を受けることがわかった。これは、合金形成(PdLi_7)による活量変化のためと考えられる³³⁾。

$\text{H}_2|\text{H}^+$ 対の電極反応とPdの水素吸蔵反応に基づき反応特性を検討した。Fig. 12に示すように、CVの1周目では陽極波が観察されなかったが、2周目以降では現れた。 -0.9 V 付近の陰極波が水素吸蔵反応で、 0.5 V 付近の陽極波が水素吸蔵反応の逆反応であることが判明した。 H_2 吸蔵前のPd電極では、静止電位が 0.1 V 付近であったが、2周目以降の静止電位は負側へシフトし、Fig. 11のpH 1.0における静止電位 -0.2 V に近づくことが分かった。

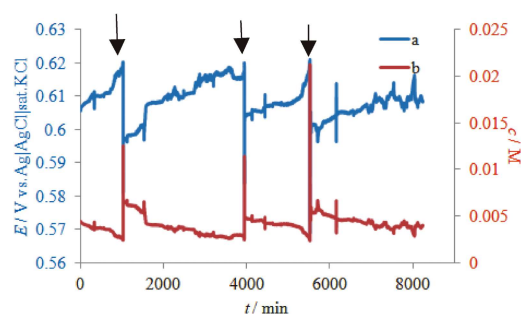


Fig. 14 Time-courses of the resting potential of a NO_3^- -ISE and concentration of NO_3^- in the culture solution. a) Resting potential; b) concentration of NO_3^- .

5 栄養成分濃度自動制御システムの構築

5・1 各栄養成分濃度測定用ISEの作製

植物の生育に必要な三要素(N, K, P)を必要量与えると、成長を促進でき、収穫量や品質の向上が期待される。そこで、水耕栽培における栄養元素の自動濃度管理システムの構築を試みた(Fig. 13参照)³⁴⁾³⁵⁾。硝酸イオン選択性電極(NO_3^- -ISE)及びリン酸イオン選択性電極(H_2PO_4^- -ISE)として、前述のNPOE液膜型電極及びコバルト修飾電極を使用した。カリウムイオン選択性電極(K^+ -ISE)としては自作のNPOE液膜型イオンセンサを使用した。すべてのイオン選択性電極の電位は、 $10^{-5} \sim 10^{-1} \text{ M}$ の濃度範囲で各イオン濃度の対数に対して線形的に応答した。これらの電極を用いることにより、培養液中の NO_3^- 、 H_2PO_4^- 及び K^+ の濃度変化をモニタリングした。また、植物による水分の吸収・蒸散の影響も大きいため、水分量を一定に保つようにした。水分量維持系は、2本の電極を用いて、水量が減少して一方の電極が水面上に表出すると回路が開状態になることを利用した。その信号をトリガーとして、一定量(2.5 mL)の蒸留水を滴加し、培養液体積(2 L)がほぼ一定となるようにした。

5・2 各栄養成分濃度自動制御システムの構築

植物による吸収によって各イオン濃度の減少を確認したのち、各ISEに閾値を設定した。 NO_3^- -ISE、 H_2PO_4^- -ISE及び K^+ -ISEの電位の閾値をそれぞれ 0.62 V (約1.6 mM)、 -0.43 V (約2.5 mM)及び -0.05 V (約2.5 mM)に設定し、植物の吸収により設定値よりも低濃度になると各イオンを1 mM含む水溶液をそれぞれ7.5 mL、2.5 mL及び7.5 mLずつ添加した(Fig. 14~16中の矢印)。各成分の補給溶液は、点滴用のビニール袋に入れ、閾値に到達するとローガーから信号が制御器(PLC)に入り、補給溶液を培養液に入れるための送液管のバルブのコックが短時間開くようにした。このようにして、それぞれのイオン濃度を自動的

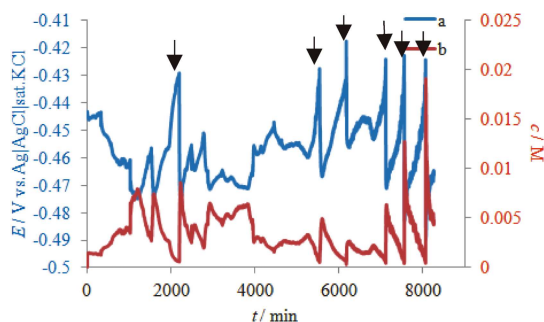


Fig. 15 Time-courses of the resting potential of a H_2PO_4^- -ISE and concentration of H_2PO_4^- in the culture solution

a) Resting potential; b) concentration of NO_3^- .

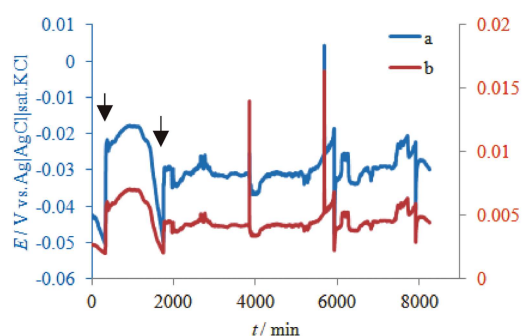


Fig. 16 Time-courses of the resting potential of a K^+ -ISE and concentration of K^+ in the culture solution

a) Resting potential; b) concentration of NO_3^- .

にはほぼ一定に保持できる肥料濃度自動管理システムを構築した (Fig. 14~16). パソコン制御やポンプなどを使用しない簡素な系で, 水耕栽培における栄養元素の自動濃度管理システムを構築した.

4 結 言

液膜型の硝酸イオンセンサは一般的に再現性と安定性があまりよくないことが知られている. その特性から, 共存する塩化物イオンの影響と考えられるため, できる限りその影響を失くしたところ, 優れた応答特性のセンサの構築が可能となった. また, リン酸イオンセンサについても溶存酸素濃度が一定となるようにすることで, 再現性と安定性のよいセンサを構築することに成功した. pH については, 水素を吸蔵したパラジウム電極がセンサ電極として使用できることが判明し, ガラス電極と比べてアルカリ誤差が現れにくいことも明らかとなった. 硝酸イオンセンサ, リン酸イオンセンサ, カリウムイオンセンサを用いて, 水耕栽培の培養液中の栄養成分濃度を自動制御できる系の構築に成功した.

謝 辞

本研究の一部は, 市村清財団「植物研究助成」(第 27 回, 第 29 回, 第 30 回) の支援によりなされたことを付記し, ここに謝意を表します.

(平成 31 年 3 月 27 日, 電気化学会第 86 回大会, 平成 31 年 3 月 26 日, 2019 年度日本農芸化学会大会, 平成 30 年 9 月 13 日, 第 78 回分析化学討論会, *Anal. Sci.*, **36**, 201-206 (2020), *Electrochem. Commun.*, **282**, 242-246 (2018), *Anal. Sci.*, **35**, 595-598 (2019), *Anal. Sci.*, **34**, 1373-1377 (2018), *Electrochim. Acta*, **282**, 242-246 (2018) において一部発表

文 献

- 1) S. A. Barber : "Soil Nutrient Bioavailability-A Mechanistic Approach", 2 nd ed., (1995), (John Wiley & Sons, Inc., New York).
- 2) G. R. Shaver, F. S. Chapin, III : *Ecology*, **6**, 662 (1980).
- 3) I. G. Burns : *Plant Soil*, **142**, 221 (1992).
- 4) V. H. Smith, G. D. Tilman, J. C. Nekola : *Environ. Pollu.*, **100**, 179 (1999).
- 5) M. Zamparas, I. Zacharias : *Sci. Total Environ.*, **496**, 551 (2014).
- 6) L. Fewtrell : *Environ. Health. Perspectives.*, **112**, 1371 (2004).
- 7) Y. Nakano, H. Sasaki, A. Nakano, K. Suzuki, M. Takaichi : *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, **79**, 47 (2010).
- 8) N. M. Crawford : *Plant Cell*, **7**, 859 (1995).
- 9) G. F. Wang, K. Satake, K. Horita : *Talanta*, **46**, 671 (1998).
- 10) R. Kissner, W. H. Koppenol : *Methods Enzymol.*, **396**, 61 (2005).
- 11) C. Wardak : *Electroanalysis*, **26**, 864 (2014).
- 12) G. Högg, O. Lutze, K. Cammann : *Anal. Chim. Acta*, **335**, 103 (2014).
- 13) Y. Fukao, Y. Kitazumi, K. Kano, O. Shirai : *Anal. Sci.*, **34**, 1373 (2018).
- 14) E. Nakao, Y. Kitazumi, K. Kano, O. Shirai : *Anal. Sci.*, in press.
- 15) V. O. Ebuele, D. G. Congrave, C. D. Gwenin, V. Fitzsimmons-Thoss : *Anal. Lett.*, **51**, 834 (2018).
- 16) R. K. Meruva, M. E. Meyerhoff : *Anal. Chem.*, **68**, 2022. (1996).
- 17) R. De Marco, C. Phan : *Talanta*, **60**, 1215 (2003).
- 18) K. Xu, Y. Kitazumi, K. Kano, O. Shirai : *Electrochim. Acta*, **282**, 242 (2018).
- 19) U. Oesch, D. Ammann, W. Simon : *Clin. Chem.*, **32**, 1448 (1986).
- 20) A. J. Bard, R. Parsons, J. Jordan : "Standard Potentials in Aqueous Solution", (1985), (Marcel Dekker, Inc., New York and Basel).
- 21) S. Saja, E. Torquebiau, E. Hainzelinc, J. Pagesc, F. Maraax : *Agric. Ecosyst. Environ.*, **250**, 20 (2017).
- 22) K. Jha, A. Doshi, P. Patel, M. Sha : *Artificial Intelligence in Agriculture*, **2**, 1 (2019).
- 23) D. S. Domingues, H. W. Takahashi, C. A. P. Camara, S. L. Nixdorf : *Comp. Electron. Agric.*, **84**, 53 (2012).
- 24) H.-J. Kim, W.-K. Kim, M.-Y. Roh, C.-I. Kan, J.-M. Park, K. A. Sudduth : *Comp. Electron. Agric.*, **93**, 46 (2013).

- 25) F. X. Rius-Ruiz, F. J. Andrade, J. Riu, F. X. Rius : *Food Chem.*, **147**, 92 (2014).
- 26) K. Xu, Y. Kitazumi, K. Kano, O. Shirai : *Anal. Sci.*, **36**, 1141 (2020).
- 27) 木原壯林, 加納健司 : “電気分析化学”, p. 182 (2012), (共立出版).
- 28) 大堺利行, 加納健司, 桑畑 進 : “ベーシック電気化学”, p. 56 (2000), (化学同人).
- 29) 玉虫伶太 : “電気化学 第2版”, p. 33 (1991), (東京化学同人).
- 30) Z. Samec : *Pure Appl. Chem.*, **76**, 2147 (2004).
- 31) Y. Marcus : *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **87**, 2995 (1991).
- 32) K. Xu, Y. Kitazumi, K. Kano, T. Sasaki, O. Shirai : *Anal. Sci.*, **36**, 201 (2020).
- 33) K. Xu, Y. Kitazumi, K. Kano, O. Shirai : *Electrochem. Commun.*, **107**, 73 (2019).
- 34) K. Xu, Y. Kitazumi, K. Kano, O. Shirai : *Anal. Sci.*, **35**, 595 (2019).
- 35) K. Xu, Y. Kitazumi, K. Kano, O. Shirai : *Anal. Sci.*, **36**, 1141 (2020).

Development of Electrochemical Sensors for Nutrient Components

Osamu SHIRAI^{*1}, Keisei SOWA¹ and Yuki KITAZUMI¹

^{*} E-mail : shirai.osamu.3x@kyoto-u.ac.jp

¹ Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8502

(Received June 2, 2021; Accepted June 23, 2021)

Nutrient control is especially important to improve the yield of crops. It is necessary for continuous nutrient control to continuously measure the concentration of the nutrient components. Especially, the concentrations of K^+ , NO_3^- , NH_4^+ , $H_2PO_4^-$, and HPO_4^{2-} are important factors for plant growth. Electrochemical measurements using ion-selective electrodes (ISEs) are very attractive because the culture solution can be used for measurements of the nutrient concentrations without any pretreatment, and the concentrations can be rapidly evaluated on the spot. The authors' research group has improved stable ISEs of NO_3^- , $H_2PO_4^-$, and HPO_4^{2-} suitable for long-term measurements. As for the NO_3^- -ISE, the sensing function was improved by eliminating the effect of coexisting Cl^- . As for the $H_2PO_4^-$ -ISE; the potential response can be stabilized by controlling the dissolved oxygen concentration in the solution. In this critical review, the preparation methods of these ISEs and their physicochemical properties are explained. We made a simple automatic management system for the nutrient concentration in a hydroponic culture solution using K^+ , NO_3^- , and $H_2PO_4^-$ -ISEs. In addition, we made a new pH sensor using Pd, which is one of hydrogen storage metals, since a glass electrode is easily broken, and it is difficult to miniaturize. The physicochemical properties of the pH sensor using a Pd electrode is also described.

Keywords: nutrient; nitrate; phosphate; potassium; electrochemical sensor; pH.