

電気化学検出に基づく FIA

九州大学大学院工学研究院 石松 亮一

1. はじめに

FIAとは、よく知られた通り、流れを利用し、連続的にサンプルを測定する実用的な手法である。分析化学では選択的にかつ高感度な測定が求められており、FIAでもこの原則に基づいて様々な前処理法や選択的検出法が開発されている。前処理や選択的検出は測定対象に適応した様々な手法が存在するが、最終的に結果を信号として取り出す際には、大別して光(吸光度、蛍光、化学発光等の変化)と電気(酸化還元電流、電位、電気伝導度等の変化)応答に基づいているであろう。光検出では光源と光電子増倍管などの光検出器が用いられ、電気化学的検出では電極と電流計、電圧計や電気伝導度計が用いられる。FIAでは、その簡便さから、光検出が好まれる傾向にあると感じているが、筆者としては電気分析化学を主に研究してきた身であり、電気化学的検出に興味があるので、今回は、最近発表されたFIAに関する論文の中で、電気化学検出(特に電位や電流変化)を用いた興味深い研究に焦点を当てたい。

2. 電気化学的検出の原理

電気化学的検出では、まず、検出する物質のピーク電位をサイクリックボルタンメトリーなどによって測定し、それをいくらか超えた電位をFIA検出に用いる電極に印加する必要がある(図1)。こうすることによって、検出電極に到達した測定物質は速やかに酸化(あるいは還元)されて、電流応答を示す。水溶液を用いる場合、バックグラウンド電流が流れにくい(分極窓が広い)グラッシーカーボン(GC)電極や、表面をチオール等で修飾しやすい金電極がしばしば用いられる。ボロンをドーブしたダイヤモンド

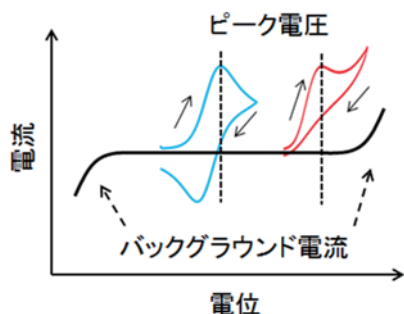


図 1. サイクリックボルタモグラム (酸化波) の模式図。低電位側：可逆系，高電位側：非可逆系。水溶液系では非可逆なサイクリックボルタモグラムに出会う頻度が高い。

ンド(BDD)電極もバックグラウンド電流が流れにくい特性があり、散見される。これらの電極はそのまま用いる場合と(前処理等で分離して検出)、表面を被覆して(選択性を持たせる)使用される場合がある。2電極式の場合、酸化還元電流が流れるとともに電圧降下(IRドロップ)が起こり、余分な電圧の印加が必要となるので、電極電位を制御したい場合は3電極式が用いられる。3電極式では、作用極と対極の間に電流を流し、参照極に対する電位を作用極に印加するので、電圧降下の影響をかなり防げる。対極は安定な金属である白金が望ましいが、測定を妨害しなければステンレス等でも代用可能である。参照極は、塩化銀で被覆された銀線(Ag|AgCl)をKCl水溶液に浸漬した一体型電極が安定な電位を与えるためよく用いられる。測定溶液に塩化物イオンが存在すれば、銀塩化銀線だけでも安定な電位が得られる。

3. 非被覆電極を用いたFIA

Mikaらは去痰薬の一種であるBromhexine (図2上)の電流応答に基づいたFIA検出を行っている。彼らは錠剤中のBromhexineの濃度定量法の確立を目的としている。GCペー

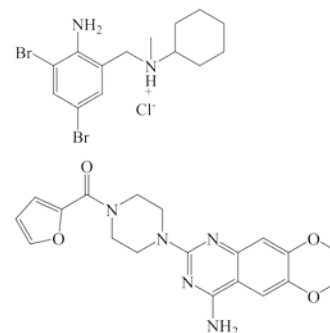


図 2. Bromhexine 塩酸塩 (上) と Prazosin (下) の構造。

pH=9の条件下で、0.8 V vs Ag|AgCl (3 M KCl)の電位を印加すると、この物質の酸化電流が観察される。バッチ系で、2.0 μM 、フロー系で0.31 μM の検出限界を得ている[1]。この系では電極に選択性を持たせていないので、0.8 V付近で酸化される物質が混入していると、目的物の濃度を実際より高く見積もってしまう。

Guedesらは高血圧や前立腺肥大症の治療に用いられる交感神経遮断薬の1種であるPrazosin (図2下) のFIA定量を、BDD電極を使って行っている。この物質はpH = 4で、1.0 V 付近から酸化電流が、-0.5 V付近から還元電流が観察される (共に、vs Ag|AgCl (飽和KCl))。生体サンプルへの応用を目的とし

ているのであろう。尿酸とアスコルビン酸の共存下での定量を行っている。この時、目的物質の還元電流も観察されることに着目し、まず、正電位に電位をステップさせ、尿酸とアスコルビン酸を反応（消費）させ、その後、負電位にステップすることによって、Prazosinのみの電流応答を得ることに成功している。この方法では、尿酸やアスコルビン酸が100倍の濃度で存在しても、Prazosinの電流応答は3%程度しか変化しない。定量限界は0.5 μM であった[2]。

Walpenらは、多種のフミン酸等の抗酸化力をFIA法で明らかにしている。GC電極を用い、2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic

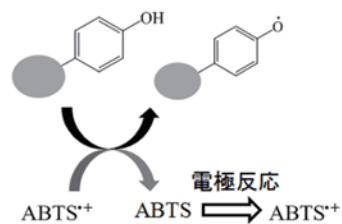


図3. フミン酸のFIA検出原理。ABTSの酸化電流を検出する。

acid) のラジカルカチオン($\text{ABTS}^{\cdot+}$) をメディエーターとして用いている。 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ はフェノール基を持つ物質と反応し、自身はABTSに還元される(図3)。この還元されたABTSを電極で酸化し、その時の電流からフミン酸等の抗酸化力を間接的に見積もっている。ABTSは開放電圧で速やかに酸化されるので、この論文では印加電圧の制御は行っていない[3]。

4. 表面被覆電極を用いたFIA

電極表面への被覆は、選択性や触媒作用を持たせるために行われる。ここでは単純なものから、比較的複雑な修飾の順番に紹介したい。もちろん複雑であればいいというわけではない。個人的には、理解しやすさの点から、単純な構造を好んでいる。

Channonらは、BDD電極の上に白金ナノ粒子を修飾し、薬物中の不純物であるヒドラジン (N_2H_4) の定量を試みている。

ヒドラジンは電気化学的に酸化されにくい、白金ナノ粒子が存在すると、比較的低電位で酸化される。この電位 (0.1 V vs $\text{Ag}|\text{AgCl}$ in 0.2 M PBS) では、薬物中に多量に存在する

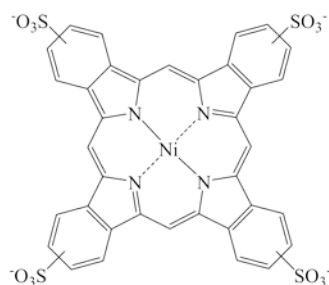


図4. Ni(II) tetrasulfophthalocyanineの構造。

であろうアセトアミノフェンは酸化されず、ヒドラジンのみの電流を検出できる。定量限界は64.5 nMで

あった[4]。

ShaidarovaらはGC電極上にNickel(II) polytetrasulfophthalocyanine (図4) の膜を形成し、通常、電気化学的に酸化が困難なシスチン、メチオニン、システインの検出を行っている。ここでは、電圧を印加すると、ポリフタロシアニン膜中のNi(II)がNi(III)へ酸化される。この時、近傍に RS^- が存在すると(塩基性条件下)、中心金属のNi(III)は RS^- によって還元され、Ni(II)となるが、すぐに電極反応を経てNi(III)と酸化される。これによって、電流値の増幅が起こり、FIAではnMレベルの定量が可能である。RSHから RS^- へ解離するpHはアミノ酸によって異なり、pHを調整することによって、この3種類のアミノ酸の選択的検出が可能である[5]。

Ogonczykらは、酸化インジウムスズ (ITO) 上にアミノプロピルトリエトキシシランを修飾し、スルホ基を表面に有するカーボンナノ粒子のFIA検出を行っている。近年、ナノ粒子が多く分野に展開されており、ナノ粒子の検出法の開発は意義があるように思われる。この検出原理は、ITO表面の正に帯電したアミノ基に、負に帯電したカーボンナノ粒子が吸着すると、アスコルビン酸の酸化を促進するので、アスコルビン酸の酸化電流をモニタリングすることによって、結果としてカーボンナノ粒子が検出できるというものである。平均粒子径が13 nmであるカーボンナノ粒子の1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの定量が可能であるという[6]。

Kitikulらは、グルタミン酸選択性電極を作製し、FIA定量を行っている。選択性電極の構造はやや複雑で、GC電極上に金ナノチューブ、カーボンナノチューブ、キトサン、グルコースオ

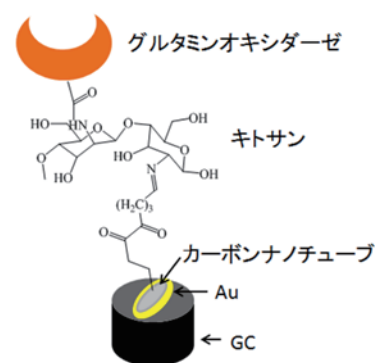


図5. Kitikulらが用いたグルタミン酸選択性電極の模式図。

キシダーゼが存在する。金ナノチューブはおそらく、GC電極とのバインダーの役割と、表面積の増大に用いられていると考えられる。カーボンナノチューブを用いると、酵素活性が低下しにくくなるという報告もあるとのことである。キトサンは酵素を修飾する際の足場である。この電極を用いると、pH = 7.4の条件下で、0.7 V vs $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (in 0.1 M PBS) 付近

から、酵素によって触媒されたグルタミン酸の酸化に伴う電流が観察され始める。FIAでの検出限界は $1.2\ \mu\text{M}$ であった[7]。

Martosらは金電極上にチオールを介してドーパミンに特異的に結合するRNAアプタマーを修飾し、血清中のドーパミンの定量を行っている。金電極表面はアミノ基を末端に持つチオールでも被覆されている。溶液のpHを調整することによって、電極表面のアミノ基は正に帯電し、ドーパミンや血清に含まれるであろう夾雑物（カテコールアミン類）のアミノ基も正に帯電するので、静電反発によって、RNAアプタマーに捕捉されにくくなっている。これによってドーパミンに対する選択性をさらに向上させている。この電極では、 $\text{pH}=7.4$ の条件下で、 $0.1\ \text{V vs Ag/AgCl (0.1 M KCl)}$ 付近から酸化電流の増加が観察され、FIAではドーパミンの検出限界は $62\ \text{nM}$ であった[8]。

Huiらは、金ナノワイヤー上にグルタルアルデヒド、ウシ血清アルブミン、グルコースオキシダーゼ（GOx）、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）を修飾した電極を用いて、高いサンプル処理能力を持つグルコース検出法を報告している。酵素を使うことによって、グルコースの酸化に必要な印加電圧を低下させることができる。GOxとHRPを同時に修飾することによって、夾雑物による妨害を低減している。バッチ系で明瞭な酸化電流は観測されなかったものの、 $0.1\ \text{V vs Ag/AgCl (3M KCl)}$ 付近で電流応答が最大になっている。グルコースの濃度範囲が $5\sim 1000\ \mu\text{M}$ において電流応答が線形に変化している。酵素を用いているので、尿酸には応答しないことが示されている[9]。

5. その他の電気化学に基づくフロー系

非被覆電極はサンプル中に妨害物質が無いとわかっている場合や、検出電極に到達する前に分離する前処理を施して用いられる場合が多く、被覆電極では、電極それ自身に選択性を持たせるので、サンプルをそのまま測定できる場合が多い。選択性は、抗体、酵素、アプタマーなどの特異的な相互作用を利用し、選択性を高める場合と、触媒活性によって印加電圧を低減し、妨害物質の酸化を防ぎ、結果として選択的な応答を得る場合がある。

最後に、ここまで紹介してきたアプローチとはやや異なる応用について紹介したい。

Sansukらはカーボンナノチューブを絶縁膜上に展開し、FIAの電極として用いている。この時、カーボンナノチューブは絶縁膜上に非常にまばらに存在

し、カーボンナノチューブのネットワークを形成しているため、電気伝導は確保されているが、電極の表面積が極端に減少する事になる（図6左）。つまり充電電流を極端に低減することができる。しかしながら、反応電流は、十分な電圧を印加すると、カーボンナノチューブ上で展開する各拡散層がオーバーラップすることによって、影響を受けない（図6右）。FIA法でも、充電電流はベース電流の増加につながることがあり、検出限界の向上を妨げる要因の一つである。彼らは、選択性はないものの、ドーパミンの検出限界が $50\ \text{pM}$ まで向上したことを報告している[10]。

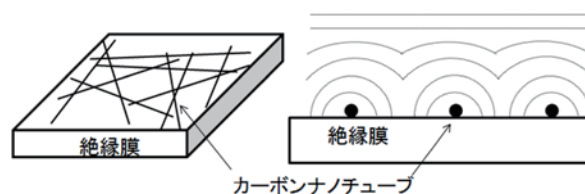


図 6. カーボンナノチューブ電極（左）と拡散層の広がり模式図（右）。

Blasovらは、ポリイオン選択性電極を用いて、薬剤であるプロタミンとヘパリンのFIA検出を行っている。ヘパリンは抗凝固薬であり、プロタミンはヘパリンを阻害する。これらは近紫外—可視光領域で光吸収が無く、また酸化還元もされにくい物質であるので、吸光度や酸化還元電流に基づく検出は困難である。彼らは、この2種類のポリイオンに対するイオノフォアを用いたイオン選択性電極を作製し、FIA検出を行っている。この場合、ネルンスト式に従って、濃度差に応じた電位差が発生するので、電位変化をモニターしている。共に、数十 $\mu\text{g/mL}$ 程度の定量が可能であった[11]。

Liらは炭素電極上にアントラキノン进行を固定化し、フロー系で過酸化水素製造電極として用いている。まず、電極表面のアントラキノンが還元されると、ジイオールが生成

し、溶存する酸素と反応することによって、過酸化水素が生成する（図7）。連続的に過酸化水素を生成する系であるが、生成した過酸化水素水には支持電解質が含まれているため、この除去が必要である[12]。

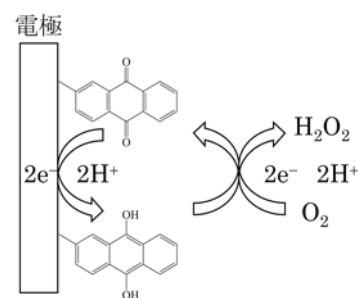


図 7. ヒドロキノン被覆電極を用いた過酸化水素の生成の模式図。

おわりに

本稿では、電気化学検出に基づくFIAに関するいくつかの最近の研究を紹介してきた。電気化学測定では、ラベリングが不要な場合が多く、実験の手間が少ないものの、光分析と比べて、やや熟練を要するように思う。また、電極に選択性を持たせるためには、電極表面を修飾する必要がある、煩雑であるので、FIAの検出器をしてはやや敬遠されがちである。しかしながら、光検出は困難だが、電気化学応答は比較的得やすいといった物質は数多く存在するので、筆者としても、目的にあった検出系を選択し、さらに、FIAにしかできない系を開発することによって流れ分析に貢献していきたい。

参考文献

- [1] J. Mika, J. C. Moreira, A. Nemeckova, J. Zima, J. Barek, H. Dejmekova, *Monatsh. Chem.*, **2015**, *146*, 1211.
- [2] T. J. Guedes, M. F. Alecrim, F. M. Oliveria, A. B. Lima, S. L. Barbosa, T. P. Santos, *J. Solid State Electrochem.*, **2016**, *20*, 2445.
- [3] N. Walpen, M. H. Schroth, M. Sander, *Environ. Sci.*, **2016**, *50*, 6423.
- [4] R. B. Channon, M. B. Joseph, E. Bitziou, A. W. T. Bristow, A. D. Ray, J. V. Macpherson, *Anal. Chem.*, **2015**, *87*, 10064.
- [5] L.G. Shaidarov, A. V. Gedmina, I. A. Chelnokova, M. L. Artamonova, H. C. Budnikov, *J. Anal. Chem.*, **2016**, *68*, 536.
- [6] D. Ogonczyk, M. Gocyla, M. Opallo, *Analyst*, **2016**, *141*, 4319.
- [7] J. Kitikul, S. Satienperakul, A. Preechaworapun, P. Pookmanee, T. Tangkuram, *Electroanalysis*, **2016**, *in press*.
- [8] I.A-Martos, E. E. Ferapontova, *Anal. Chem.*, **2016**, *88*, 3608.
- [9] J. Hui, J. Cui, Y. Wang, Y. Zhang, J. Liang, X. Zhang, W. Chen, E. E. Ogabiela, S. B. Adeloju, Y. Wu, *J. Electrochem. Soc.* **2014**, *161*, B291.
- [10] S. Sansuk, E. Biziou, M. B. Joseph, J. A. Covington, M. G. Boutelle, P. R. Unwin, J. V. Macpherson, *Anal. Chem.*, **2013**, *85*, 163.
- [11] A. K. B-Blasov, J. Zajda, A. Eldourghamy, E. Malinowska, M. E. Meyerhoff, *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, 4041.
- [12] Q. Li, C. B-McAuley, N. S. Lawrence, R. S. Hartshorne, C. J. V. Jones, R. G. Compton, *J. Solid State Electrochem.*, **2014**, *18*, 1215.