高速く形波ボルタモグラムのピーク面積を用いた定量分析

青木幸一^①， 前田和伸， 徳田耕一， 松田博明*， 長谷部 清**

(1987 年 2 月 12 日受理)

高感度かつ高速測定可能な高速く形波ボルタンメトリーは電極形状によらないベル型のボルタモグラムの示し，それとベースラインとで囲まれる面積は，く形波振幅に比例する．その比例定数は電流の次元を持つ．固体電極，特に生体内反応の検出器として用いられているカーボンファイバー電極により， $K_3Fe(CN)_6$ の還元く形波ボルタモグラムの測定することによって濃度と面積の比例性及び定量限界を検討した．く形波振幅を変えることは，(1) 装置上極めて容易であること，(2) ピーク電流は変わるがボルタモグラムの形状は変化しないこと，及び (3) ピーク面積に比例することから，本法はノイズの多い系又は微量定量分析にふさわしい方法の一つである．

1 緒 言

1952 年，Barker ら¹⁾ によって考案されたく形波ボルタンメトリーは，近年，電極速度論ばかりでなく^{2)~6)}，電気分析化学⁷⁾⁸⁾，例えばキレート試薬の定量⁹⁾，生体内反応関連物質の定量^{10)~12)}，アノードックストリッピングボルタンメトリー¹³⁾¹⁴⁾に應用されてきた．最近の計算機の発達のおかげで，自動制御によるく形波ボルタモグラムの測定は言うに及ばず，実験結果と理論との比較検討も容易にできるようになった^{15)~19)}．本手法のうちに分析化学上特に興味深いのが，数十 mV 以上の大きな振幅をもつ高速く形波ボルタンメトリーである²⁰⁾²¹⁾．最近それに関する総説が報告されている²¹⁾．この手法における電位の波形及び電流のサンプル方法を Fig. 1 に示す．この電位-時間曲線は，直流成分と考えられる線形走査電位の部分と交流であるく形波電位の部分との重畳から成っている．従って，本法は直流ボルタンメトリーと交流ボルタンメトリーの両方の特性を生かすことが可能である．順パルス応答電流と逆パルス応答電流との差を，両方向パルスの平均電位に対してプロットしたものを高速く形波ボルタモグラムとする．これは次のような特徴をもつ．

(1) 水銀滴下電極では分析感度が， $10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$

ほどもある⁸⁾．

(2) ボルタモグラムは対称でピークの形をしているので，ピークの高さを直読できる．

(3) 同じパルス幅・く形波振幅では微分パルスボルタンメトリーよりも高いピークを示す²²⁾²³⁾．

(4) 1 V 程度の電位領域にわたるボルタモグラムの数秒以内で測定できる．

(5) 可逆ボルタモグラムの形状は電極の形状によらない²⁴⁾．

(6) ボルタモグラムのピークの面積（電力の次元をもつ）は電極の形状によらずにく形波振幅に比例する²⁴⁾．

特徴(6)の展開として，測定装置におけるパルス応答の遅れのためピーク電流が理論値より大きく測定されるときでも，ピーク面積は理論値に一致する²⁴⁾．く形波振幅の変化によるピーク面積のプロットの傾きは電流の次元を持つので，ピーク電流に相当する量である．従って，その傾きから分析濃度を求めることができる．平板電極を用いた場合，分析種の拡散係数が分かれば理論式{式(15)²⁴⁾}を用いて濃度の絶対測定が可能である．く形波電位の主なパラメーターはく形波振幅と周波数（又はパルス幅）であるが，く形波振幅を変えることは周波数を変えることに比べて，測定技術の観点から著しく容易である．注目するボルタモグラムがベース電流から区別しにくいときでさえ，本法ではピーク面積がく形波振幅に比例すると思われる部分を，意味のあるボルタモグラムと見なすことができる利点がある．

本研究では，比較的安価に市販されているポテンシ

* 東京工業大学大学院総合理工学研究科：227 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

** 北海道大学理学部化学科：060 北海道札幌市北区北十条西八丁目

スタットを用い, 白金極細線及び生体内電気化学的分析に用いられているカーボンファイバー電極で測定したく形波ボルタモグラムのピーク面積が, どの程度の低い濃度までく形波振幅に比例するかを検討し, 更に絶対定量可能な濃度を求めたので以下に述べる。

2 実 験

ポテンシオスタットには HESC-318B (扶桑製作所)の一部を改良したものを用いた。このポテンシオスタットは本来, 微小電流 (数十 pA) 測定用に作られたもので, ノイズを抑えるためにローパスフィルターが入っている。そのために電流のパルス応答が遅い。そこで電流-電圧変換回路の電圧出力をフィルターに通さず, 直接記録計 (ここでは A/D 変換器) に取り出すようにした。又, 電流-電圧変換回路の抵抗 ($1 \sim 10 \text{ M}\Omega$) に並列して 1 nF の容量が入っているが, 電流のパルス応答を速めるため, 0.5 nF の容量に取り替えた。この改良により, 20 ms の電位パルスに応答する 1 nA 程度の電流をほぼ応答の遅れなく測定可能であることを確かめた。

Fig. 1 に示すような電位パルス発生には, パーソナルコンピュータ if-800/30 (沖電気製) で制御された 12 ビット D/A 変換器を用い, そのく形波の電圧出力をポテンシオスタットの外部入力に入れた。一つの電位パルス終了前の 20 ms の間, 1.25 ms ごとに 16 個の電流を 12 ビット A/D 変換器を通してサンプルし, その相加平均を ($\tau/2 - 10 \text{ ms}$) 時間におけるパルス応答電流

Fig. 1 Potential time curve in square-wave voltammetry

ΔE : potential step height, E_{sw} : square-wave amplitude, τ : square-wave period or twice of the pulse width, t_s : duration for current sampling

とした。この平均化は, 50 Hz 電源から混入するノイズを見掛け上小さくするためである。ここで $\tau/2$ はパルス幅, すなわち τ はく形波の 1 周期である。この平均応答電流は $\tau = 50 \text{ ms}$ のとき, 5% 以内で ($\tau - 10 \text{ ms}$) における瞬間電流に等しい²⁴⁾。順パルス応答電流と逆パルス応答電流との差を, パルス電位の中央値に対してプロットすることにより電流-電位曲線を得た。計算機の画面上でボルタモグラムにベースラインを引き, その差からピーク電位, ピーク電流, 半値幅, 及び台形公式によりピークの面積を求めた。

平板電極は白金板電極をエポキシ樹脂に埋め込み, その一部を切り出すことによって作製したが, 二重層容量が $150 \mu\text{F cm}^{-2}$ を超えてしまい²⁴⁾, 50 ms のく形波幅では容量電流の影響がかなり残る。これはおそらく白金と樹脂との間に電解液が入り込んだためであろうと思われる。そこで電極絶縁面積の小さいと考えられる白金極細線 (直径 $1 \mu\text{m}$, 長さ約 3 mm) を用いた。これは白金極細線をリード線にはんだ付けした後, リード線及びはんだの部分をエポキシ樹脂で被覆したものである。一方, 同様な方法でカーボンファイバー (直径 $9.30 \mu\text{m}$, 長さ約 10 mm , トレカ T 300) 電極を作製した。この場合, カーボンファイバーとリード線とは銀ペーストで電気的接触をとった。カーボンファイバー電極の直径は電子顕微鏡を用いて測定した。参照電極は飽和カロメル電極 (SCE) である。

電極活性物質である $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 及び支持電解質である KCl は特級試薬をそのまま用いた。水は蒸留し更に過マンガン酸カリウムを滴下して蒸留したものを用いた。測定前に 20 分間, 支持電解質を含む溶液に窒素を流すことにより溶存酸素を除去した。測定は室温で行った。

3 結果と考察

支持電解質溶液中 ($0.5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$) においてサイクリックボルタンメトリーを用いて容量性電流を測定することにより, 電極の良否及び再現性を調べた。白金電極では $-0.2 \sim 1.0 \text{ V vs. SCE}$ の範囲で約 $30 \mu\text{F cm}^{-2}$ であったが, 支持電解質溶液中においていったん Fig. 1 のような形波をかけると, 二重層容量が $100 \mu\text{F cm}^{-2}$ にも達する。その後どんな領域で電位を掃引しても, 又蒸留水・酸・有機溶媒中で超音波洗浄しても, 初期の低い二重層容量をもつ表面が得られなかった。白金極細線の表面を機械的に研磨できないので, この電極では一度の測定しかできなかった。一方, カーボンファイバー電極ではく形波をかけた前後でも二重層容量はほと

んど変化せず、約 $10 \mu\text{F cm}^{-2}$ であった。従って本実験では、主としてカーボンファイバー電極を用いた。

Fig. 2 に $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ のく形波ボルタモグラムの示す。ピーク電位は、く形波振幅 ($E_{\text{sw}} = 10 \sim 100 \text{ mV}$)、パルス幅 ($\tau/2 = 30 \sim 100 \text{ ms}$) にかかわらず、高濃度 ($c^* \geq 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) では $0.210 \pm 0.006 \text{ V vs. SCE}$ であった。しかし低濃度 ($c^* < 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) では正側にずれ (0.223 V)、誤差も $\pm 0.02 \text{ V}$ 程度に達した。

Fig. 2 Square-wave voltammetric responses measured in $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($0.5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$) at the carbon fiber electrode

$\Delta E = 10 \text{ mV}$, $\tau/2 = 50 \text{ ms}$, (A) $E_{\text{sw}} = 60 \text{ mV}$ and (B) $E_{\text{sw}} = 80 \text{ mV}$

半値幅 $W_{1/2}$ は高濃度 ($c^* \geq 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) では $\pm 5 \text{ mV}$ の誤差で、次の理論式²³⁾を十分満たした。

$$W_{1/2} = (RT/nF) \times \frac{3.53 + 3.46(nFE_{\text{sw}}/RT)^2}{(nFE_{\text{sw}}/RT) + 8.1} \dots (1)$$

ここで n は反応の電子数、 F はファラデー定数、 R は気体定数である。半値幅は濃度が高くなるにつれて誤差を伴い、 $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ の溶液では $\pm 30 \text{ mV}$ もの誤差があった。

ベル型の理論ボルタモグラムの形状の評価は次の修正 log プロットで表される²⁴⁾。

$$\begin{aligned} E &= E^{\circ'} + (2.3RT/nF) \log [z - (z^2 - 1)^{1/2}] \quad (E \leq E^{\circ'}) \\ E &= E^{\circ'} + (2.3RT/nF) \log [z + (z^2 - 1)^{1/2}] \quad (E > E^{\circ'}) \end{aligned} \dots (2)$$

$$z = (\Delta I_p / \Delta I) [1 + \cosh(nFE_{\text{sw}}/RT)] - \cosh(nFE_{\text{sw}}/RT)$$

ここで ΔI_p はピーク電流、 ΔI はある電位における電流、 $E^{\circ'}$ は式量電位である。そのプロットの直線の逆傾斜は、高濃度 ($c^* \geq 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) 領域では $61 \pm 5 \text{ mV}$ であり理論値 (60 mV) に近いが、低濃度 ($c^* \leq 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) ではプロットが直線からずれることが多く、その逆傾斜の値のばらつきは $\pm 20 \text{ mV}$ にもなる。換言すれば、低濃度のボルタモグラムはベル型ではない。従ってピーク電位及びピーク電流の決定に不確定さが残る。

理論によると²⁴⁾電力の次元をもつピーク面積 S_T は次式で与えられる。

$$S_T = 2nFc^*E_{\text{sw}}A \left[-2 \left\{ \sum_{j=1}^m (-1)^j f[(j/2)\tau'] \right\} + f[(m+1/2)\tau'] \right] \dots (3)$$

ここで A は電極の面積、 m は 2 から 4 の整数、 τ' は $(\tau - 10) \text{ ms}$ 、 f は電極活性物質の溶液内の拡散による電極形状因子である。 f の例として、平板電極の場合には $0.9853(D/\tau)^{1/2}$ であり²³⁾、円筒電極の場合には²³⁾

$$\begin{aligned} f(t) &= (D/a) [(\pi\theta)^{-1/2} + 0.422 + 0.0675 \log \theta \\ &\quad + 0.0058 \operatorname{sgn}(\log \theta - 1.47) (\log \theta - 1.47)^2 \\ &\quad \dots (4) \end{aligned}$$

ただし $\theta = Dt/a^2$ 、 D は拡散係数、 a は円筒電極の半径、 t は電解時間、 $\operatorname{sgn}(\pm x) = \pm 1$ ($x > 0$; 複合同順) である。式(3)から明らかなように、 S_T は E_{sw} に比例することが分かる。その比例定数は電流の次元をもつ。Fig. 3 に S_T と E_{sw} との関係を示す。ただし縦軸は電極の長さ 1 cm (電極面積では $2.92 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$) 当たりの電力の次元をもつピーク面積に換算してある。高濃度 ($c^* \geq 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) では S_T と E_{sw} との間に強い比例関係が成立し、相関係数は 0.996 以上であった。濃度が低くなるにつれ ($c^* \leq 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) ノイズのため S_T のばらつきが大きくなる。例えば、 5×10^{-7} 及び $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ における相関係数はそれぞれ 0.98 及び 0.72 であった。しかし本法によれば、相関係数が 0.7 程度であっても十分比例する直線を引くことが可能である。

Fig. 4 に S_T の E_{sw} に対するプロットから求めた比例定数の対数と、濃度の対数の関係を示した。これらは理論と一致して傾き 1 の直線上にある。 $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ では少し大きな比例定数となるが、これは残余電流が電位の複雑な関数となって、その差し引きが不十分なことによると思われる。本装置を用いたとき、 $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ 付近が定量可能な限界濃度であると言える。

$\log(S_T E_{\text{sw}}^{-1})$ のプロットにおいて、その直線の $\log$

Fig. 3 Plots of S_T against E_{sw} measured in (●) 5×10^{-7} and (○) 10^{-7} mol dm $^{-3}$ $K_3Fe(CN)_6$ solutions at $\tau/2 = 50$ ms

Fig. 4 Variations of $\log S_T$ with $\log c^*$
The slope of the straight line is unity

c^* 軸への切片から式(3)における比例定数 $2nFA\{-2[\sum_{j=1}^m (-1)^j f(j/2)/\tau'] + f[(m+1/2)\tau']\}$ を求めると, $11.2 \text{ A cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ となる. 一方, ノーマルパルス及び微分パルスボルタメトリーで求めた拡散係数 $D = 6.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ $\{0.5 \text{ mmol dm}^{-3} K_3Fe(CN)_6, 0.5 \text{ mol dm}^{-3} KCl, \text{白金平板電極}\}$ $\tau = 50 \text{ ms}$ 及び $a = 4.65 \mu\text{m}$ を式(3)に代入し式(2)からその比例定数を計算すると $10.6 \text{ A cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ となる. 両者は良く一致する. 従って拡散係数を適切に見積もれば, 検量線を用いることなく, $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ までの電極活性物質の絶対定量が可能となる.

$E_{sw} < 30 \text{ mV}$ のときピーク電流は E_{sw} に比例するが, $E_{sw} > 80 \text{ mV}$ ではピーク電流はほぼ一定値となる²⁾. 一

方, S_T は E_{sw} の大きさの制限なく E_{sw} に比例するため, 幅広い E_{sw} の値をとることができる. すなわち大きな E_{sw} を用いたほうが S_T の感度が上がる. しかし大きな E_{sw} ではピーク幅も大きくなり, 分析能が落ちる.

電極活性物質濃度が低いとき, 高速く形波ボルタモグラムの残余電流及び電気的ノイズのためベル型とは異なるゆがんだ形状となり, ピーク電位及びピーク電流を一義的に決定しにくい. 実際, $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ の濃度ではピーク電位・半値幅・修正 $\log$ プロットにおける直線の傾きは理論値とは異なることがある. ピーク電流値もかなりばらつく. そのような場合, ピーク面積がく形波振幅に比例することを利用して, 定量分析をすることが可能であることを示した. く形波振幅を変えることによるボルタモグラムの形状の変化は小さく, 又測定装置上の問題としてく形波振幅を変えることは極めて容易であるため, 本方法は S/N を高める有望な手段である. 又, カーボンファイバー電極においてかなり再現性の良いデータが得られたことから, 生体内反応の検出手段に応用可能であると思われる.

文 献

- 1) G. C. Barker, I. L. Jenkins : *Analyst* (London), **77**, 685 (1952).
- 2) H. Matsuda : *Z. Elektrochem.*, **62**, 489 (1957); **62**, 118 (1958).
- 3) G. C. Barker : *Anal. Chim. Acta*, **18**, 118 (1958).
- 4) K. Okamoto : *Rev. Polarogr.* (Kyoto), **12**, 40, 50 (1964).
- 5) L. Ramaley, M. S. Krause : *Anal. Chem.*, **41**, 1362 (1969).
- 6) M. S. Krause, L. Ramaley : *Anal. Chem.*, **41**, 1365 (1969).
- 7) E. J. Zachowski, M. Wojciechowski, J. Osteryoung : *Anal. Chem.*, **183**, 47 (1986).
- 8) P. A. Readon, G. E. O'Brien, P. E. Sturrock : *Anal. Chim. Acta*, **162**, 175 (1984).
- 9) Z. Stojek, J. Osteryoung : *Anal. Chem.*, **53**, 847 (1981).
- 10) M. Shah, J. Osteryoung : *Anal. Chem.*, **54**, 586 (1982).
- 11) A. Webber, M. Shah, J. Osteryoung : *Anal. Chim. Acta*, **154**, 105 (1983); **157**, 1 (1984).
- 12) A. Webber, J. Osteryoung : *Anal. Chim. Acta*, **157**, 17 (1984).
- 13) M. Wojciechowski, W. Go, J. Osteryoung : *Anal. Chem.*, **57**, 155 (1985).
- 14) C. Wechter, N. Sleszynski, J. J. O'Dea, J. Osteryoung : *Anal. Chim. Acta*, **175**, 45 (1985).
- 15) J. H. Christie, J. A. Turner, R. A. Osteryoung : *Anal. Chem.*, **49**, 1899 (1977).
- 16) J. J. O'Dea, J. Osteryoung, R. A. Osteryoung : *Anal. Chem.*, **53**, 695 (1981).
- 17) J. J. O'Dea, J. Osteryoung, R. A. Osteryoung :

- J. Phys. Chem.*, **87**, 3911 (1983).
- 18) J. J. O'Dea, M. Wojciechowski, J. Osteryoung, K. Aoki : *Anal. Chem.*, **58**, 954 (1986).
- 19) D. Whelan, J. J. O'Dea, J. Osteryoung, K. Aoki : *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **202**, 23 (1986).
- 20) J. Osteryoung, R. A. Osteryoung : *Anal. Chem.*, **57**, 101A (1985).
- 21) J. Osteryoung, J. J. O'Dea : "Square-Wave Voltammetry" in "Electroanalytical Chemistry", Edited by A. J. Bard, Vol. 14 (1986), (Marcel Dekker, Inc., New York).
- 22) S. Borman, *Anal. Chem.*, **54**, 698A (1982).
- 23) K. Aoki, K. Tokuda, H. Matsuda, J. Osteryoung : *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **207**, 25 (1986).
- 24) K. Aoki, K. Maeda, K. Tokuda, H. Matsuda, J. Osteryoung : *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, submitted.

☆

Analysis through use of peak areas of fast scan square-wave voltammograms. Koichi AOKI, Kazunobu MAEDA, Koichi TOKUDA, Hiroaki MATSUDA* and Kiyoshi HASEBE** (*Graduate School at Nagatsuta, Tokyo Institute of Technology, 4259, Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 227; **Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Kita-10, Nishi-8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060)

The current response to the potential square-wave with large amplitude and large effective potential scan rate exhibits a bell-shaped voltammogram, which is independent of electrode geometry and of which area compassed by a base line is proportional to the square-wave amplitude. The proportionality of the area to the amplitude was explored in a solution of $K_3Fe(CN)_6$ ($10^{-7} \sim 5 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$) at the carbon fiber electrodes, which have often been used as an *in-vivo* electrochemical detector. Since the voltammogram at 10^{-7} mol dm $^{-3}$ analyte was largely deformed from the ideal bell shaped one due to involvement of electric noises and residual currents, it was difficult to discern a peak current and peak potential visually from the voltammogram. The proportional constant, however, could be evaluated readily by plotting the peak area against the amplitude. The proportional constant was in good agreement with the value calculated from the diffusion coefficient and electrode area. Square-wave experiment with variation of the amplitude is a promising analytical technique of enhancing *S/N* ratios.

(Received February 12, 1987)

Keyword phrases

square-wave voltammetry with large amplitude and large potential scan; carbon fiber electrodes; an *in-vivo* electrochemical detector.