使える 解析テクニック! 具体例で説明する 電気化学測定法

対流ボルタモグラム (2) フローインジェクション分析法・電気化学センシング

渡辺 剛志, 栄長 泰明

1 はじめに

フローインジェクション分析法 (Flow Injection Analysis, FIA) とは、キャリアー液として適当な液体を連続的に流しておき、その液体の流れの中に液体試料を注入して測定する自動分析法である。注入試料は一つの試料ゾーンを形成し下流に位置する検出器に輸送され、検出器のフローセルを通過するときに、吸光度や電極電位、電流などの物理的パラメータの変化が連続的に記録され、試料中の分析対象物質の濃度などを測定する。FIA は分析化学分野からできた測定手法であり、検出器としては電気化学的検出器に限らず、一般的には光学的手法の検出器が用いられることが多い。本稿では、電気化学的検出器を備えたフローインジェクションシステムを前提とする。

FIA の特長としては以下の点が挙げられる。

- ①迅速な測定：通常、1 時間あたり 30 ～ 60 試料の分析を行うことができる。
- ②試料・試薬の少量化：通常、FIA では試料は 100 μl 程度あれば充分である。1 回の測定で使用する試薬の残も手分析手法と比べると、1/10 ～ 1/100 程度ですむ。
- ③簡単な操作：試料を注入するだけの簡単な操作で質の高い分析が可能であり、初心者でも簡単に扱することができる。
- ④高感度・高精度：装置構成に大きく依存するが、一般的に分析の高感度化、高精度化が達成でき、低濃度の試料についても分析が可能となる。

また、上に挙げた以外にも、比較的構成が単純なことも長所といえよう。ポンプや検出器があれば、それらをチューブで介して連結するだけで、FIA 装置を自作することができる。

Fig. 1 FIA 装置の概略図。

2 FIA の装置構成

FIA のシステムの構成を Fig. 1 に示す。ポンプ、試料注入バルブ、移動相溶液貯留器、フローセル付き検出器、レコーダーが揃い、それぞれを移動相溶液が通るチューブで連結すれば基本的な測定を行うことができる。ポンプには、脈流の生じづらいペリスタポンプやプランジャーポンプが用いられる。注入バルブは、市販の FIA システムではループ付きロータリーインジェクションバルブが付属していることが多く、便利である。このようなインジェクションバルブではループ部分を交換することで、サンプル量を変えることができる。Fig. 1 に示したシステムは最も単純な構成といえるが、一般的には気泡が細管中に生じるのを防ぐために、ポンプよりも上流側にデガッサーを配置することが多い。液相中で化学反応や酵素反応させてから生成した物質を検出する場合には、検出器とインジェクションバルブの間に、反応コイルや酵素固定化カラムを配置させることができる。フローインジェクション分析は、スタートである試薬貯留器とゴールとなる検出器の間に、適切な順序で各パーツを配置するだけなので、目的の分析に応じたカスタマイズが容易にできることが特長である。電気化学的に検出する場合には、検出器としてはポテンショスタットを用いることができる。電気化学的な測定法としてはアンペロメトリック測定が最もよく利用される。検出部のフローセルの構造は電気化学的な検出器においては非常に重要となる。電気化学検出では、電極表面で生じる電気化学反応に起因する物理量を読み取ることから、フローセル中の平均物質濃度でなく、電極表面に到達する電極活性な化学種の数が信号の大小を決めることになる。フローセルにおける電極の配置の仕方は、3つのタイプに大別することができる (Fig. 2)。

(A)：管状型検出器：この型の検出器の感応部は、流路に挿入された細管や流路の直線状部分に設けられた2つの切片で構成される。

(B)：ワイヤー型検出器：ワイヤー状の電極を感応表面が

Fig. 2 電気化学的検出器のタイプ (S: 感応面)。

(A) 管状型, (B) ワイヤー型, (C) カスケード型。

Fig. 3 代表的なフローセルの形状。

(a) 円筒電極, (b) 流れに平行に配置された平板電極, (c) 流れに垂直に配置された平板電極, (d) ウォールジェット電極。

Table 1 フローセルにおける電極の形状と拡散限界電流の式。

電極の幾何学的分類	拡散限界電流の式
円筒電極	$i = 1.61nFC(DA/r)^{3/2}v^{1/3}$
チャンネルフロー電極	$i = 1.47nFC(DA/b)^{2/3}v^{1/3}$
平板電極(流方向に垂直に配置)	$i = 0.903nFCD^{2/3}v^{-1/6}A^{3/4}U^{1/2}$
ウォールジェット電極	$i = 0.898nFCD^{2/3}v^{-5/12}a^{-1/2}A^{3/8}v^{3/4}$

a : ジェット流入部直径, A : 電極面積, b : チャンネル高さ, n : 反応電子数, F : ファラデー定数, C : 反応物濃度, D : 拡散係数, v : 動粘性率, r : 管状電極の半径, v : 平均体積流量率 (cm^3/s), U : 流速 (cm/s).

流れの軸に沿って設置される。

(C): カスケード型検出器: 溶液の流れが電極感応部表面に正面からまたは斜め方向から当たる方式の検出器である。

FIA では, 試料ゾーンは多層になっているため, 極端な場合には, その化学種が感知されずにフローセルを通過してしまう。この現象は Fig. 2 (A) のような直線状の測定用チャンネルにおいて, その作りが悪く電極感応面が壁部の凹部にあるときに最も起こりやすい。市販の FIA システムでは, 平板電極が配置できるカスケード型のセルが付属していることが多い。

FIA 測定で観測される電流は, フローセルの構造や電極の配置の方法により決まる。Fig. 3 に示す代表的なフローセルの構造における, 強制対流条件下での拡散限界電流は Table 1 に示すような式で表される¹⁾。フローセルの構造がシンプルで, 液体の流れが正確に定義できるような場合には, Table 1 に示した式となるが, FIA ではいかに高感度に迅速に分析できるかが重要視され, 実際に用いるフローセルの構造は単純でない場合が多いため, これらの式がそのまま適用できるとは限らない。ここではフローセルの構造の電流への影響について述べたが, 一般的なフローインジェクション分析についての解説は成書^{2,3)}に詳しいので参照されたい。

3 センシングへの適用

3.1 タンパク質の電気化学検出

タンパク質の分析において特に簡便さやコストの低減を目標とする場合, 電気化学的手法の利用が効果的であり, 多くの研究が行われている。電気化学的な手法によるタンパク質の分析は, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) をベースとする手法, 金属タンパク質を測定対象にした手法, タンパク質を構成するアミノ酸残基を電気化学的に直接酸化させる手法がある。ここで, 3つ目に挙げたアミノ酸残基部位を直接酸化する方法についてホウ素ドーブダイヤモンド電

極を用いた FIA により測定した例⁴⁾について紹介する。タンパク質の電気化学的検出に FIA を用いることには, 次のような利点がある。1つは大きなタンパク質では拡散速度が遅いため, 強制対流を用いることで, 電極表面への物質供給量を増加させ, 高感度測定につながる点である。また電極表面上を連続的に液体が流れていることにより, 電極表面に物理吸着するような物質が電極近傍に留まることを抑制することができ, 物理吸着を受けにくい点が挙げられる。タンパク質の測定においては, 電極表面への物理吸着が生じることによるシグナルの減少がしばしば問題となるため, タンパク質の電気化学測定において FIA を利用することは効果的といえる。

上述したように FIA における測定では, 電極に定電位を印加し, 電流応答をモニターするアンペロメトリックな測定が一般的であるが, 測定にあたっては, まず検出に適する電位条件を検討するために, ハイドロダイナミックボルタモグラムの作成する。ハイドロダイナミックボルタモグラムは, 各測定電位で一定の濃度の同じ試料を注入し, その電流を電位に対してプロットしたグラフである。最も高いシグナル/ノイズ (S/N) 比あるいは, シグナル/バックグラウンド比 (S/B 比) が得られる電位を測定電位として選ぶとよい。Fig. 4 は代表的なタンパク質として知られるウシ血清アルブミン (BSA) のダイヤモンド電極を用いた FIA におけるハイドロダイナミックボルタメトリより得られた S/B 比と電位の関係である。移動相溶液には 0.1 M リン酸緩衝液 (Phosphate Buffer Solution, PBS) を用いており, 1 ml/min で送液した。0.8 V vs. Ag/AgCl において最も高い S/B 比が得られたことから, ダイヤモンド電極での BSA の測定においては 0.8 V vs. Ag/AgCl を最適な検出電位として選択した。FIA では, 基本的に移動相である電解質溶液を流しながら電極に定電位を印加した定常状態における電流をモニターしており, 注入した試料が電極表面に到達した際に生じる目的の電気化学反応に由来する電流の増加を測定する。従って, CV などの測定法とは異なり, 電気二重層の充電は完了した状態とみなせ, バックグラウンド電流は主に不純物の電気化学反応に由来するファラデー電流といえる。バックグラウンド電流やノイズを小さくするためには, 移動相に用いる溶液の調製方法や試薬のグレードに注意する必要がある。また印加する電位によっては, 溶媒の電気分解が生じ, バックグラウンドを増加させる要因となる。Fig. 4 を例にすると, 0.8 V vs. Ag/AgCl において S/B が最大となり, 0.9 V よりも高電位において S/B が減少しているのは, 水の電気分解が僅かに生じ始めたことにより, バックグラウンド電流が増加し, その増加の割合がシグナルの増加に比べ大きくなったためである。水溶液系での測定であれば, 印加電位を高くしていくと酸素発生反応により気泡が生成するため, 高すぎる電位は安定した測定ができなくなり好ましくない。Fig. 5 に 0.8 V vs. Ag/AgCl を検出電位として行った電流応答の BSA 濃度依存性を示す。

BSA の濃度の増加に従い, 電流値も増加していることが確認できる。サイクリックボルタメトリにおいては, BSA の測定を行った際には, 1 サイクル目には酸化ピークが確認されるが, 2 サイクル目以降はタンパク質の電極表面への吸着や汚染のために電流ピークは著しく低下してしまう。FIA では, 強制対流により反応生成物が移動相とともに常に排出

されるため、電極表面の汚染が起きにくく連続的な分析が可能となる。さらにダイヤモンド電極に限定すれば、その高い化学安定性から、正側あるいは負側に大きく電位を変化させることで、電極の表面の付着物を除去し洗浄し回復させることもできる。グラッシーカーボンなどの他の炭素電極では、高い電位を印加すると、電極表面が荒れるなどの少なからずダメージが残る。FIA 分析では、強制対流を利用しているため、表面積の変化は電流値に影響を与えやすい。電気化学

Fig. 4 ハイドロダイナミックボルタモグラム.

移動相: 0.1 M PBS (NaH_2PO_4 0.02 M + Na_2HPO_4 0.08 M, pH 7.4), 流速: 1 ml/min, 電極: ホウ素ドーブダイヤモンド電極, 注入試料: 300 mg/dl BSA.

Fig. 5 電流応答の BSA 濃度依存性.

(A) 75–3000 mg/l (B) 2.5–75 mg/l. 電位: 0.8 V vs. Ag/AgCl. 移動相: 0.1 M PBS, 流速: 1 ml/min, 電極: ホウ素ドーブダイヤモンド電極.

的に電極を洗浄できるダイヤモンド電極はタンパク質のような電極上に吸着しやすい試料を測定するケースでは有効な電極である。ここで示したように、電極反応により生じた生成物が電極上に吸着や堆積してしまうような測定系に対しての FIA の適用は、それらによる電極の汚染を抑制できる点で効果的である。

3.2 *in vivo* ドーパミン測定シミュレーションへの FIA の適用

ドーパミンは脳内神経伝達物質と知られ、ドーパミンニューロンが減少してドーパミンが少なくなることでパーキンソン病が起きるとされている。また、ドーパミンは様々な生理活動における行動の動機付けに関与していると言われている。よって、脳内におけるドーパミン濃度を測定することで、パーキンソン病を代表とした病気の原因を探ることや、特効薬開発の早期発見に繋げることができ、さらには生体活動のメカニズムを探る重要な手段ともなる。近年、脳内ドーパミン濃度の測定として、電気化学的な測定が利用されている。マウスやラットの生体内に直径 $\sim 10 \mu\text{m}$ 程度のカーボンファイバー電極を挿入し、高速ボルタンメトリやパルスボルタンメトリを用いて、*in vivo* でドーパミンの電気化学検出が行われている。病気の発見や生体活動の解明を行う上では、刻々と変化していく物質をその瞬間で捉える必要がある。例えば、何らかの刺激を動物に与えたときにドーパミン放出が起こるか否かを判断できなければならない。そのような観点において電気化学手法は適していると考えられている。*in vivo* 測定を行うためには、使用する電極の *in vitro* での評価が必要であり、フローセルを用いた *in vitro* 測定は、生体内での状況を擬似的に再現できるような測定システムといえる。Fig. 6 に、筆者らがドーパミンの *in vitro* 測定に使用した手作りのフローセルシステムの概略図と写真を示す。この装置は液溜にシリンジを用いており、そのシリンジと三方活栓をチューブにて接続し、それぞれの三方活栓を連結させて流路を作製している。三方活栓のコックにより流路を変える仕組みとなっている。流速やドーパミンのサンプリング量を厳密に制御することはできないが、脳内のドーパミン放出をシミュレーションするには十分なフローセルといえる。いずれのパーツもコストが安く簡単に手に入るため、誰にでも作れる簡易の FIA 装置といえる。脳内での *in vivo* 測定に用いる電極はロッド状であり、このフローセルにおいては流路の出口

Fig. 6 自作した簡易の FIA システムの概略図と写真.

Fig. 7 フローセルを用いたドーパミンのアンペロメトリック応答. 移動相: 0.1 M PBS, 試料: 40, 200, 1000 nM ドーパミン (DA) (0.1 M PBS 中), 電位: 0.6 V vs. Ag/AgCl, 電極: ホウ素ドーパダイヤモンド, 測定順: 0.1 M PBS → 40 nM DA → 0.1 M PBS → 200 nM DA → 0.1 M PBS → 1000 nM DA → 0.1 M PBS.

部分にロッド状のホウ素ドーパダイヤモンドのマイクロ電極を挿し込み使用した⁵⁾. Fig. 7はこの簡易の FIA 装置を使用して行ったダイヤモンドのマイクロ電極におけるドーパミンの 0.6 V vs. Ag/AgCl におけるアンペロメトリック応答である. 0.1 M PBS を 10 秒間流した後, 40 nM ドーパミンを含む 0.1 M PBS に流路を切り替え, また 10 秒後に 0.1 M PBS に切り替え, さらに同様にして 200 nM ドーパミン, 1000 nM ドーパミンに対する応答を評価した. コックの切り替えなどによる流路ノイズが多少観測されたものの, 40 nM の低濃度のドーパミンに対しても明確な応答が観測できており, 簡易な FIA 装置にしては十分に安定した測定結果を与えている. このように, *in vivo* 測定などでの刻々と物質の濃度が変化する系をシミュレーションする場合にも FIA を適用することができる. またポテンショスタットを所有していれば, 簡単に手に入る部品を組み合わせるだけで, 測定が行えることも FIA の特長であるといえる.

4 おわりに

FIA の特徴と装置構成について, 特に電気化学的手法の検出器を使用する場合のフローセルの構造と電極の幾何配置が電流にどのように影響するかについて簡単に解説した. FIA は分析化学から生まれた測定手法であり, 強制対流を

利用し, 低濃度の反応物をいかに高感度かつ迅速に測定できるかといった部分に焦点が当てられた実際の分析に特化した電気化学測定法といえる. 本稿では, 2 種類の生体関連物質の測定例を挙げ, FIA を適用するとメリットについて述べた. また, 最後に紹介した簡易な FIA 装置のように, 簡単に自作でき目的に合わせて簡単にカスタマイズできるところが FIA の魅力といえる.

文 献

- 1) A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications 2nd Edition*, Wiley, New York (2001).
- 2) J. Ruzicka, E. H. Hansen 著, 石橋信彦, 与座範政訳, フローインジェクション分析法, 化学同人, 京都 (1983).
- 3) 黒田六郎, 小熊幸一, 中村 洋, 機器分析実技シリーズ フローインジェクション分析法, 共立出版株式会社, 東京 (1990).
- 4) M. Chiku, T. A. Ivandini, A. Kamiya, A. Fujishima, and Y. Einaga, *J. Electroanal. Chem.*, **612**, 201 (2008).
- 5) S. A. Suzuki, T. A. Ivandini, K. Yoshimi, A. Fujishima, G. Oyama, T. Nakazato, N. Hattori, S. Kitazawa, and Y. Einaga, *Anal. Chem.*, **79**, 8608 (2007).

キーワード: フローインジェクション分析, センサー,

●著者プロフィール

氏 名: 渡辺 剛志 Takeshi WATANABE
所 属: 慶應義塾大学理工学部
役 職: 特別研究助教
連絡先: 〒223-8522 横浜市港北区日吉 3-14-1
電話 045-566-1790
nabeta@chem.keio.ac.jp

氏 名: 栄長 泰明 Yasuaki EINAGA
所 属: 慶應義塾大学理工学部
役 職: 准教授
連絡先: 〒223-8522 横浜市港北区日吉 3-14-1
電話 045-566-1704
einaga@chem.keio.ac.jp