

マイクロ高速液体クロマトグラフィー用電気化学検出器の進歩

後藤正志^{a)}

岐薬紀要 (1990) 39 : 1-15

要約：内径 0.5mm 以下の分離カラムを用いるマイクロ高速液体クロマトグラフィーのための電気化学検出器の進歩を中心に解説する。電気化学検出器の設定電位決定のためのサイクリック半微分ボルタンメトリー，一作用電極式電気化学検出器，二作用電極式電気化学検出器，電位走査型電気化学検出器，およびマイクロ電極を用いるインビボ・ボルタンメトリーの順に紹介する。

索引用語：マイクロ高速液体クロマトグラフィー，電気化学検出器，サイクリック半微分ボルタンメトリー，生理活性アミン，生体試料分析，三次元クロマトグラム，インビボ・ボルタンメトリー，マイクロ電極 (文60)

**Progresses in Electrochemical Detectors for Micro High-Performance
Liquid Chromatography**

MASASHI GOTO^{a)}*Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ.* (1990) 39 : 1-15

Abstract : Progresses in electrochemical detectors for micro high-performance liquid chromatography using separation columns of inner diameter less than 0.5mm are mainly reviewed. This review covers cyclic semidifferential voltammetry for determination of suitable applied potentials of various electrochemical detectors, electrochemical detectors using a single working electrode, electrochemical detectors using two working electrodes, electrochemical detectors scanning electrode potential, and *in vivo* voltammetry using micro electrodes.

Keyphrases : micro high-performance liquid chromatography, electrochemical detector, cyclic semidiffential voltammetry, physiologically active amines, living sample analysis, three-dimensional chromatogram, *in vivo* voltammetry, micro electrode (Ref 60)

- a) 岐阜薬科大学薬品分析化学教室，
岐阜市三田洞東 5 丁目 6-1
- a) Department of Pharmaceutical Analytical
Chemistry, Gifu Pharmaceutical University,
6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received February 8, 1990
The Annual Proceedings of Gifu
Pharmaceutical University,
ISSN 0434-0094, CODFN : GYDYA 9

1. はじめに

液体クロマトグラフィー (LC) は1906年ロシアの植物学者 Tswett¹⁾ によって創始されたといわれる。しかし、これが機器分析法として出発したのは1958年 Moore ら²⁾ によるアミノ酸分析計が最初であろうと考えられる。それ以来この LC は高速化の一途をたどり、1969年 Kirkland³⁾ の表面多孔性充てん剤の開発を契機として、いわゆる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が確立した。この HPLC はその後、高性能微粒子充てん剤および高性能高圧ポンプの開発、ならびに周辺技術の発展により非常に進歩し、医学、薬学、生化学、環境化学など様々な分野で盛んに利用されるようになってきた。通常の HPLC では内径約 5 mm の充てんカラムが用いられている。HPLC のマイクロ化は1967年 Horvath ら⁴⁾、1970年代半ばに石井⁵⁾ や Scott ら⁶⁾ によって試みられ、現在では世界的に注目され HPLC はマイクロ化の方向へ進もうとしている。このような内径 0.5 mm 以下の充てんカラムを用いるマイクロ高速液体クロマトグラフィー (マイクロ HPLC) や内径 0.1 mm 以下のフロー管を用いるマイクロフローインジェクション分析法 (マイクロ FIA) では使用される移動相、試薬や試料の消費量が従来の HPLC や FIA に比べて、1/100~1/1000で済むという優れた特長がある。マイクロ HPLC やマイクロ FIA で使用される移動相や試薬の流速は従来のそれが約 1 ml/min であるのに対して、一般に 1~10 μ l/min であり、このような低流速ではセル体積の小さな検出器が必要となる。HPLC の検出器としては UV をはじめとする光学検出器が最も広く使用されている。一方、電気化学検出器は低流速で電解効率が上がり有利であり、たとえセル体積が小さくても光学検出器のように感度が犠牲になることはないのでマイクロ HPLC やマイクロ FIA の検出器として特に適していると考えられる。

生体関連物質の多くは電気化学的に活性であり、それらの HPLC による分析において電気化学検出器を用いれば、特に生理活性アミンは誘導体化の必要なく高感度に検出できる。ここでは生理活性アミン及びそれらの関連物質を電気化学検出する際の電気化学検出器の設定電位決定のためのサイクリック半微分ボルタンメトリー、および貴重な生体試料を極少量で分析するためのマイクロ HPLC 用電気化学検出器の進歩を中心に、最近注目されているインビボ・ボルタンメトリーをも含めて解説する。

2. サイクリック半微分ボルタンメトリー^{7~9)}

電気化学検出器の設定電位の選択は目的物質を高感度で検出定量するために極めて重要である。従来は作用電極の電位を一点ずつ変化させて HPLC を行ない、最適設定電位を決定する方法が採られており、この測定に数時間を要した。ここでは筆者らが開発した新しい電気分析法“サイクリック半微分ボルタンメトリー”によって極短時間で目的物質が電気化学検出できるかどうかを判定し、最適設定電位を決定する方法について紹介する。

サイクリックボルタンメトリーは、試料中に作用電極、参照電極、および対極の3つの電極を挿入し、溶液静止下で作用電極に速い速度で Fig. 1 のような三角形の電圧を印加し、その際作用電極と対極間に流れる電流 (i) を参照電極に対する作用電極の電位 (E) に対して記録する方法であり、短時間 (数秒~数十秒) 内に加電圧走査を行なうため迅速分析という観点から優れた特長をもっている。なお、Fig. 1 のように試料が還元体の場合には作用電極の電位を時間 (t) に対して最初陽側へ走査し、酸化体の場合には陰側へ走査する。しかし、観察される i - E 曲線は左右非対称なピーク状であり、波形解析が複雑で共存物質の同時定量が困難であるなどの欠点があった。サイクリック半微分ボルタンメトリーとは、上記電流信号に“半微分”という演算処理を施すことにより左右対称なピーク状のグラフを得て、従来法の欠点を改良した迅速でしかも高感度で高分解能な電気分析法である。

微積分演算子の最も総括的な定義は Grünwald によって次のようになされている。

$$\frac{d^Q}{[d(t-b)]^Q} f(t) = \lim_{N \rightarrow \infty} \left\{ \frac{d^Q}{[t-b]^Q} \sum_{j=0}^{N-1} \frac{\Gamma(j-Q)}{\Gamma(-Q)\Gamma(j+1)} f\left(t - \frac{jt}{N} + \frac{jb}{N}\right) \right\} \quad (1)$$

ここで b は微積分の下限であり、 Q は正、負、整数、小数、実数、虚数のいかなる数に対しても適用できる。 Q が正のとき(1)式は微分の定義となり Q が負のとき積分の定義となる。 $Q=1/2$ のときが半微分の定義を表わすことになる。したがって、時間 t の関数である電流 i の半微分は

$$\frac{d^{1/2}}{dt^{1/2}} i \equiv e$$

と表わされ、 i 自身と電流の微分

$$a \equiv \frac{d}{dt} i$$

の中間の性質をもつ。もし、電流が時間の累乗すなわち、

$i \propto t^p$ ならば $a \propto t^{p-1}$ であり $e \propto t^{p-1/2}$ となる。また、よく知られているように電流のある時間での微分は時間軸を等間隔の微小時間 $\Delta (= t/N)$ に分割することによって

$$a \approx \frac{1}{\Delta} [i(t) - i(t-\Delta)] \quad (2)$$

で近似されるのに対して電流の半微分は

$$e \approx \frac{1}{\sqrt{\Delta}} \left[i(\Delta) - \frac{1}{2} i(t-\Delta) - \frac{1}{8} i(t-2\Delta) \dots - \frac{\Gamma\left(\frac{t}{\Delta} - \frac{3}{2}\right)}{2\sqrt{\pi} \Gamma\left(\frac{t}{\Delta}\right)} i(\Delta) \right] \quad (3)$$

によって近似される。なお、 e は電流と電流の微分量の中間の単位 $\text{ampere} \cdot \text{sec}^{-1/2}$ をもつ。

電極反応が可逆な場合には電極電位 E と電流の半微分 e の間には

$$e = \frac{n^2 F^2 A v C \sqrt{D}}{4RT} \operatorname{sech}^2 \left\{ \frac{nF}{2RT} [E - E_{1/2}] \right\} \quad (4)$$

が成立する。ここで n は酸化還元電子数、 F はファラデー定数、 A は電極表面積、 v は電位走査速度、 C は試料濃度、 D は拡散係数、 R は気体定数、 T は絶対温度、および $E_{1/2}$ は直流ポーログラフィーの半波電位である。この式が半微分ボルタンメトリーにおいて観察される曲線の形を表わす式であり、 $e-E$ 曲線が完全に左右対称なピーク状になることを示している。電極反応が非可逆なときにも $e-E$ 曲線はほぼ左右対称なピーク状となる。 $e-E$ 曲線の特徴すなわちピーク高 e_p 、ピーク電位 E_p 、およびピークの半値幅 W_p をまとめて Table I に示す。⁸⁾

ここで α は移動係数、 τ は直流ポーログラフィーにおける水銀滴下時間である。このように e_p は濃度 C に比例し定量の基礎となり、 E_p は一定の実験条件下では化学種に特有な値であり定性の基礎となる。また、 W_p は本法における分解能を表わすことになる。

電位走査速度が 100mV/sec において電極反応が可逆、準可逆、および非可逆と考えられる代表的な3種類の有機化合物について、Britton-Robinson 緩衝液

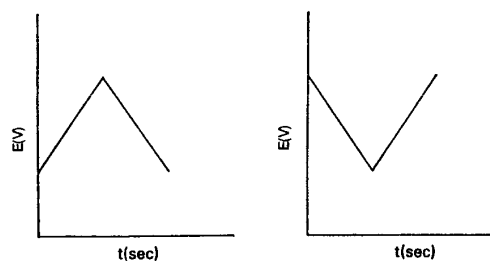


Fig. 1 Potential vs. time profiles for cyclic voltammetry.

Table I. Features of semi-derivative voltammograms

	Reversible	Irreversible
Peak height, e_p	$\frac{n^2 F^2 A v \sqrt{DC}}{4RT}$	$\frac{n^2 F^2 A v \sqrt{DC}}{3.367RT}$
Peak potential, E_p	$E_{1/2}$	$E_{1/2} + \frac{RT}{2anF} \ln \left(\frac{0.613RT}{anFv\tau} \right)$
Peak width, W_p	$3.35 \frac{RT}{nF}$	$2.94 \frac{RT}{anF}$

中でグラシーカーボン作用電極を用いて得られたサイクリック半微分ボルタモグラム ($e-E$ 曲線) を従来のボルタモグラム ($i-E$ 曲線) と比較して Fig. 2 に示す。¹⁰⁾ 曲線 A, B, および C はそれぞれ Fig. 3 に示すような可逆, 準可逆, および非可逆電極反応に対応する。

サイクリック半微分ボルタンメトリーによって, 試料が電気化学検出できるかどうかを判定し, 電気化学検出器の

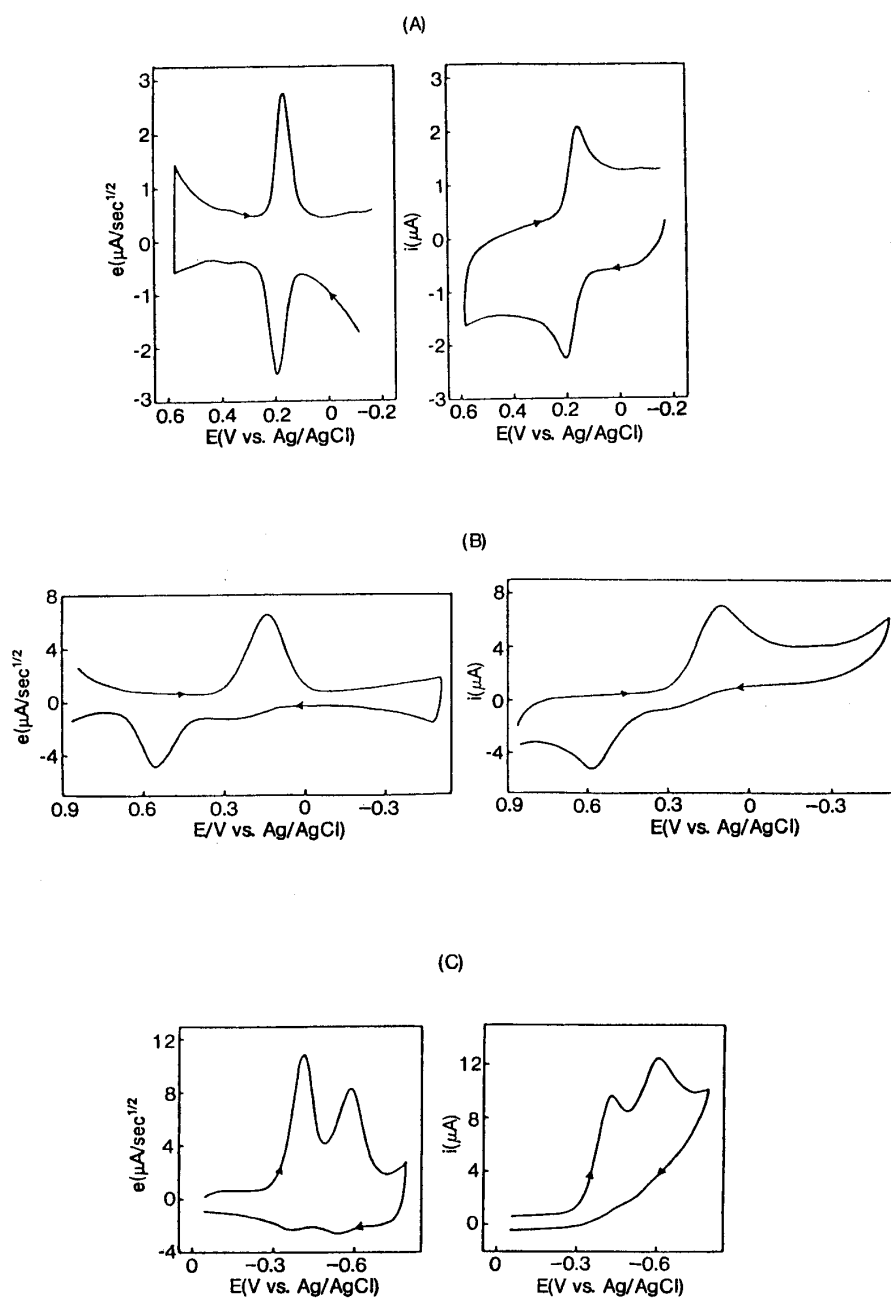


Fig. 2 Comparison of cyclic e vs. E and i vs. E curves for typical organic samples with glassy carbon working electrode in Britton-Robinson buffer at a scan rate of 100mV/sec. (A) 8 μ M p-aminophenol, pH 6.3, (B) 300 μ M p-benzoquinone, pH 2.8, (C) 100 μ M m-dinitrobenzene, pH 4.1.

最適設定電位を決定するための操作法を試料が還元体であると考えられる場合について説明する。まず、HPLCの移動相10mlに試料をその濃度が0.1~1mMになるように溶解し、電気化学検出器に使われているのと同じ材質の作用電極を用いて100mV/secの走査速度でサイクリック半微分ボルタモグラムを測定する。電極反応が可逆な場合には、酸化波と再還元波が観察され、両ピーク電位は全く一致する。電極反応が準可逆な場合には、酸化波と再還元波のピーク電位に差が生じ、電極反応が非可逆な場合には再還元波は観察されない。電気化学的に不活性な物質の場合にはピークは全く観察されない。1つの作用電極を有する電気化学検出器の場合には、作用電極に酸化ピークが終了する電位を設定すればよい。2つの作用電極を有する電気化学検出器を用いて可逆電極反応を行なう物質を選択的にしかも高感度で検出するためには第1及び第2の作用電極にそれぞれ酸化ピークが出終る電位 (E_{ea}) および再還元ピークが出終る電位 (E_{ec}) を設定すればよいことになる (Fig. 7 参照)。

3. 一作用電極式電気化学検出器

HPLC用電気化学検出器としては数多くのものが報告されているが、^{11~13)} それらは表面積の大きな作用電極を用いるクーロメトリー検出器と表面積の小さな作用電極を用いるアンペロメトリー検出器に大別できる。前者では目的物質の100%を定電位電解してその際流れる電流量を測定するのに対して、後者では目的物質の一部分だけを定電位電解してその際流れる電流を測定することによって検出定量する点において両者は異なる。HPLC用に利用されている電気化学検出器のうち、セル体積を小さくすることが容易な薄層電解セル型のアンペロメトリー検出器がマイクロHPLCやマイクロFIAに適しているといえる。

筆者ら¹⁴⁾は作用電極にグラシーカーボン、参照電極に銀一塩化銀、および補助電極(対極)にステンレス管を用いてセル体積が0.06~0.3 μ lの1つの作用電極を有する薄層電解セルを試作した。その構造をFig. 4に示す。このセルを粒径5 μ mのシリカーODSを充てんした内径0.5mm、長さ15cmのマイクロカラムによるアミノフェノール異体体の分離定量に利用した。実験条件としては0.1N過塩素酸を移動相として用い、8.3 μ l/minの流速で作用電極の電位を1.0V vs. Ag/AgClに設定して検

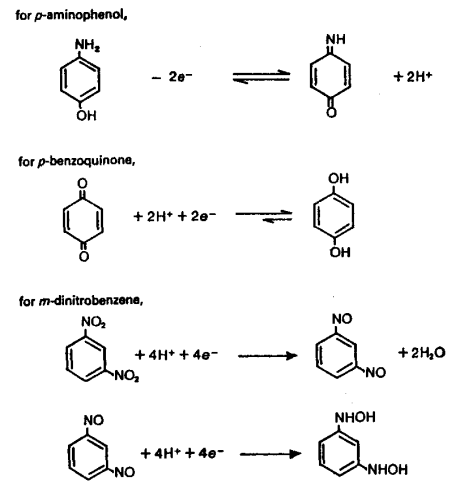


Fig. 3 Three types of electrode processes for organic compounds.

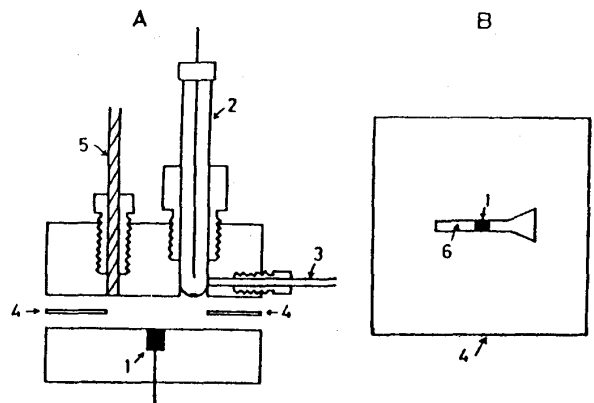


Fig. 4 Electrochemical detector cell with a single working electrode for micro high-performance liquid chromatography. (A) Side view of cell, (B) front view of spacer. 1=Working electrode (glassy carbon), 2=reference electrode (Ag/AgCl), 3=counter electrode doubling as outlet (stainless-steel tube), 4=spacer (teflon sheet), 5=micro separation column doubling as inlet, 6=slot.

出した。この条件下で本検出器の電解効率は約60%と高く、アミノフェノールに対する検出感度は通常の HPLC の場合と比べて約1けた優れていることが分かった。Hirata ら¹⁵⁾は作用電極にグラファイト、参照電極に飽和カロメル、および補助電極に白金線を使用して、セル体積が 0.15 μ l の薄層電解セルを試作し、マイクロキャピラリー分離カラムによる尿中のチロシンおよびトリプトファンの代謝物の分析に応用して良好な結果を得た。

4. 二作用電極式電気化学検出器

作用電極の電位を走査しない定電位電解電流測定法は、荷電電流の影響をほとんど受けないため良好な検出感度が得られ、HPLC や FIA における電気化学検出法として最も広く利用されている。通常の電気化学検出器の作用電極は1個であるが、より選択的検出を目的として2個の作用電極を用いる種々の電気化学検出器が開発され使用されている。2個の作用電極を有する電気化学検出器は試料溶液の流れに対する各作用電極の配置の仕方から、Fig. 5 のように3種類に大別される。¹⁶⁾ 近接並列型は流れに対して作用電極が互に近接して並列に位置しているもので、その機能は2波長 UV 検出器と類似しており、異なった電位でのピーク電流比から定性分析のための情報が得られる。この型の検出器は他の2つの型と比べて構造上セル体積が大きいので、マイクロ HPLC やマイクロ FIA には使用されていない。

直列型は流れに対して作用電極が直列に位置しているもので、その機能は蛍光検出器と類似しており、上流の作用電極での電極反応生成物が下流の電極で検出される。この型では電極反応の可逆性の差を利用して、目的物質の選択検出が可能である。筆者らは Fig. 6 のような2個のグラシーカーボン円盤（直径3 mm）を作用電極とするセル体積が 0.3 μ l の直列型薄層電解セルをマイクロ HPLC 用に試作した。4種類のカテコールアミンの電極反応が Fig. 7

に示すようにいずれも可逆的に起こることに着目し、本電解セルの上流及び下流の作用電極の電位をそれぞれ0.80Vおよび0.20V vs. Ag/AgCl に設定して、前者でカテコールアミンを酸化した後、後方で再び還元する際に流れる電流を測定することによって、尿試料中のカテコールアミンだけを選択検出することを試みた。¹⁷⁾ なお、図中の NA, AD, DA, および LD はそれぞれノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミン、およびL-ドーパを表わす。Fig. 8 は健康人の尿 100 μ l をマイクロアルミナカラム（内径0.5mm, 長さ2 cm）に直接注入して自動的に前処理を行った後、0.5mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム（HSA）を含む pH 1.8 の Britton-Robinson 緩衝液を移動相として用い、流速 8.3 μ l/min でマイクロシリカー ODS カラム（内径 0.5mm, 長さ 15cm）によって分離し、本検出器を用いて得られた尿中のカテコールアミンのクロマトグラムを示したものである。¹⁷⁾ A図およびB図はそれぞれ上流および下流の作用電極に流れる電流を記録したものである。a および b の試料ではそれぞれ NA および LD

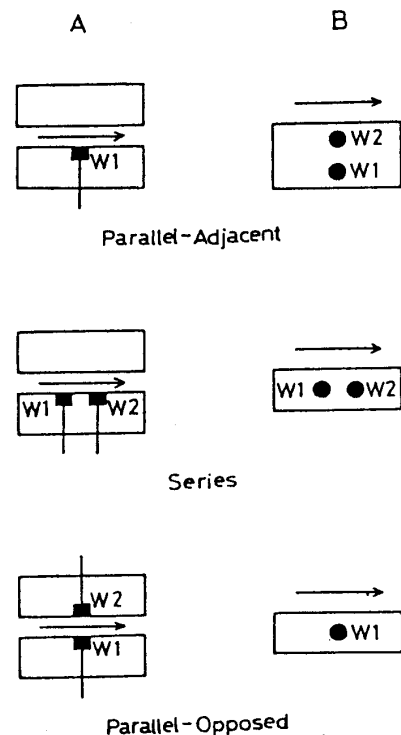


Fig. 5 Three types in configuration of dual voltammetric detector. (A) Side view, (B) front view. W1 and W2 represent the two working electrodes. The arrows show the direction of flow.

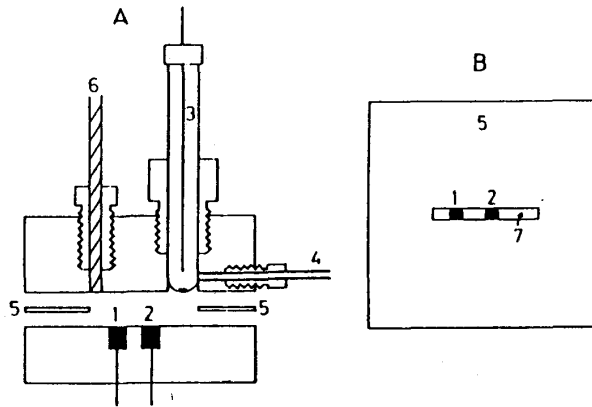


Fig. 6 Electrochemical detector cell with two working electrodes in series configuration. (A) Side view of cell, (B) front view of spacer. 1,2= Working electrodes(glassy carbon), 3=reference electrode (Ag/AgCl), 4=counter electrode doubling as outlet (platinum tube), 5=spacer (teflon), 6=micro separation column doubling as inlet, 6=slot.

が他の電気活性物質と重なっているため、上流の作用電極に流れる電流だけでは正確な定量が困難である。しかし、下流の作用電極に流れる電流を測定することによってB図のように、多くの電気活性物質の電極反応が非可逆であるので、カテコールアミンだけを選択的に検出できることが実証された。3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC), ホモバニリン酸 (HVA), および 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) などの生理活性アミンの代謝物は一般に Fig. 9 に示すように可逆又は準可逆的な電極反応を行なう。¹⁶⁾ Fig. 10 は健康人の尿 0.3 μ l をマイクロ HPLC システムに直接注入して、直列型電解セルを用いてこれらの生理活性アミン代謝物を選択検出した例を示す。¹⁶⁾ 上流および下流の作用電極の電位をそれぞれ0.80Vおよび -0.05V vs. Ag/AgCl に設定すれば、DOPAC, 5-HIAA, および HVA はいずれも下流の作用電極で還元されて非可逆電極反応物質

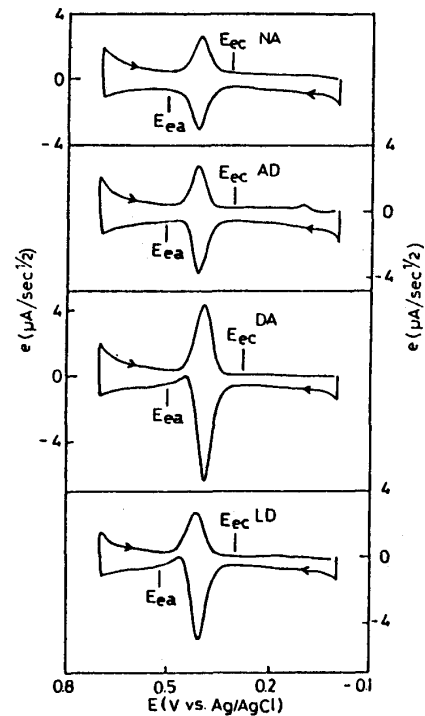


Fig. 7 Cyclic semi-derivative voltammograms of 0.1 mM catecholamines in Britton-Robinson buffer of pH 1.8 containing 0.5 mM HSA and 0.1 mM EDTA at a scan rate of 40 mV/sec.

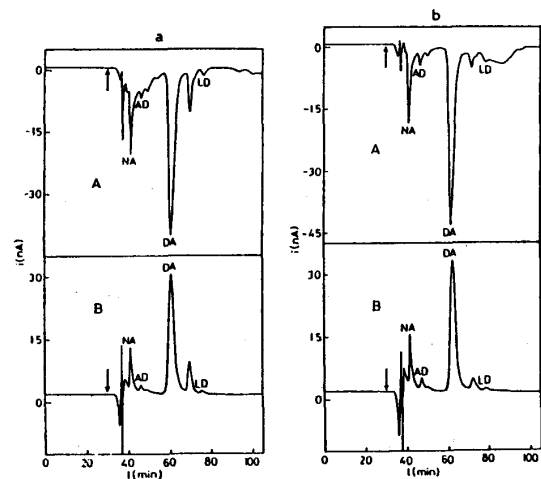


Fig. 8 Selective detection of catecholamines in two human urines by series dual electrochemical detector. (A) Anodic response, (B) cathodic response. Sample: 100 μ l of healthy human urine, applied potentials (vs. Ag/AgCl): anode 0.60 V, cathode 0.20 V, flow rate: 8.3 μ l/min.

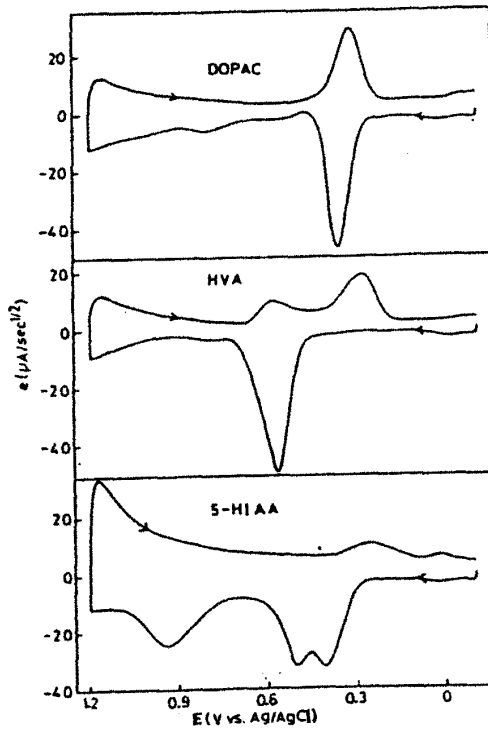


Fig. 9 Cyclic semi-derivative voltammograms of 1.0 mM DOPAC, HVA, and 5-HIAA in Britton-Robinson buffer of pH 3.6 containing 10% methanol, 50 mM sodium perchlorate and 0.1 mM EDTA at a scan rate of 100 mV/sec.

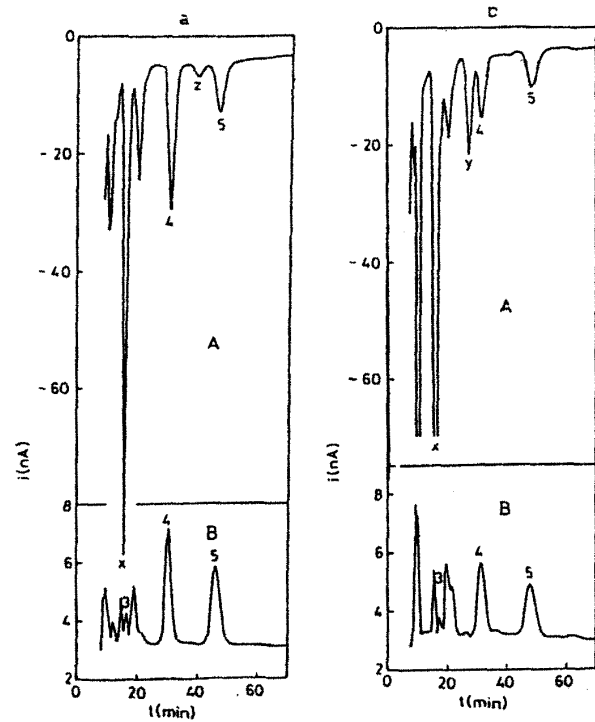


Fig. 10 Selective detection of biogenic amine metabolites in two human urines by series dual electrochemical detector. (A) Anodic response, (B) cathodic response. Peaks: 3=DOPAC, 4=5-HIAA, 5=HVA. Sample: 0.3 μ l of healthy human urine, potentials (vs. Ag/AgCl): anode 0.80 V, cathode -0.05 V, flow rate: 8.3 μ l/min.

から選択的に検出される。これらの物質の検出限界は10~20pgであった。

対向並列型は作用電極が流れに対して互に対向して並列に位置しているもので、その機能は光電子増倍管と類似しており、一方の電極での反応生成物が他方の電極上へ拡散によって到達し再び元の物質にもどる。この型では両電極間で選択的に酸化と還元が繰り返されるため、電流が増幅されて高感度が得られる。筆者らは2枚のグラシーカーボン板(長さ1cm, 幅2mm)を用いて Fig. 11 に示すような対向並列型薄層電解セルを試作し、フェリンアンイオンを試料として低流速での電流増幅率について検討した。その結果、移動相の流速を11.2から 1.4 μ l/min と減少させたとき、電流増幅率は2.4から19.5と著しく増大した。¹⁸⁾ Fig. 12 はアルミナ抽出法を自動化したマイクロ HPLC システムに健康人の限外ろ過した血清 200 μ l を注入して、対向並列型薄層電解セルを用いて得られたカテコールアミン検出例を示す。¹⁹⁾ aの試料ではAD, bの試料ではNAが他の電気活性物質との分離が不完全であるため、A図の陽極電流だけでは定量が困難であるが、B図の再還元に基づく陰極電流を測定することによって選択的に検出できる。また、2つの作用電極間における酸化と還元の繰返しにより、カテコールアミンを約 3 pg まで検出できた。

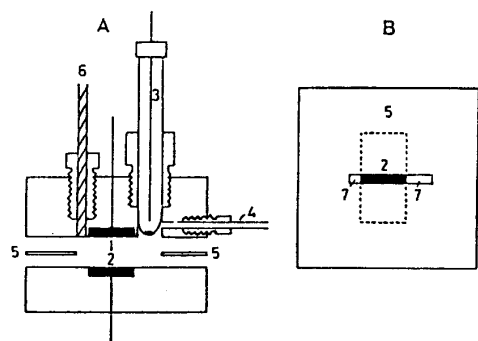


Fig. 11 Electrochemical detector cell with two working electrodes in parallel-opposed configuration. (A) Side view of cell, (B) front view of spacer. 1,2 = Working electrodes (glassy carbon), 3 = reference electrode (Ag/AgCl), 4 = counter electrode doubling as outlet (platinum tube), 5 = spacer (teflon sheet), 6 = micro separation column doubling as inlet, 7 = slot.

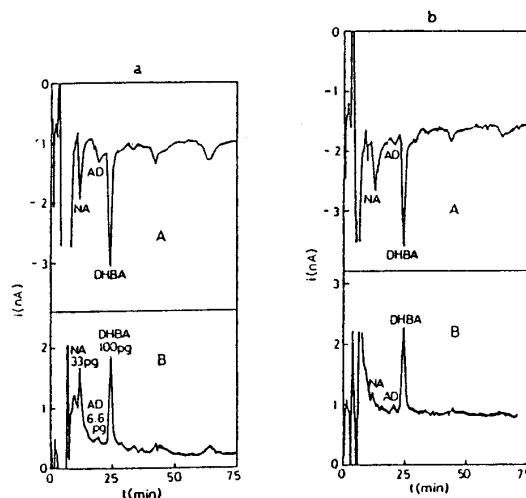


Fig. 12 Selective detection of catecholamines in two human sera by parallel-opposed dual electrochemical detector. (A) Anodic response, (B) cathodic response. Sample: 200 μ l of human serum spiked with 100 μ g of DHBA, potentials (vs. Ag/AgCl): anode 0.60 V, cathode 0.20 V, flow rate: 8.3 μ l/min.

4. 電位走査型電気化学検出器

作用電極の電位を走査する電気化学検出器は従来の定電位法によるクロマトグラムの電流-時間軸に電位軸を加えることができることから、波長走査型光学検出器やフォトダイオードアレー検出器と同様な機能を有するものとして強く期待されている。しかし、電位を速く走査すればするほど荷電電流の影響が大きくなり、検出感度が悪くなる。この荷電電流の影響を小さくする方法としては一般にパルス手法が採用されている。これらのパルス手法では作用電極に種々のパルス波形を印加後、荷電電流が小さくなった一定時間後にファラデー電流がサンプリングされる。パルス波形としては階段波^{20,21)}、普通パルス波²²⁾、微分パルス波²³⁾、矩形波^{24~29)}などが用いられている。交流ボルタンメトリー³⁰⁾も荷電電流の影響を小さくするために使用されている。しかし、いずれも決定的に荷電電流の影響を抑えるに至っていない。Hinemanら^{31~33)}は直列型二作用電極式電解セルを用いて、上流の電極の電位を走査し、下流の電極の電位を一定に保って定性情報を得る方法を提案した。下流の電極は上流の電極反応生成物又は電極反応物質の消耗をモニターするために用いられる。このように、下流の電極での応答は電位走査に基づく荷電電流の影響なしに上流の電極での目的物質の電位走査型電気化学的挙動を反映する。2.0V/secの電位走査速度で 10^{-7} Mの検出限界が達成された。しかし、さらに感度を上げるためには2つの作用電極間の相互干渉の問題を解決しなければならない。以上の電位走査型電気化学検出器では滴下水銀滴、吊下水銀滴セル、薄層電解セル、およびウォールジェットセルが用いられている。薄層電解セルやウォールジェットセルではグラシーカーボン、カーボンペースト、および白金が一般に作用電極として用いられている。これらの電極表面積は普通 $1\sim 50\text{mm}^2$ と大きく、比較的大きな荷電電流の問題を生じる。

カーボンファイバーはインビボ・ボルタンメトリーのマイクロ電極のための材質として注目されており^{34~36)}セル体積の微小化のみならず荷電電流の影響の減少化に有用である。カーボンファイバーは直径が $10\mu\text{m}$ と小さく、したがって表面積も絶対的に小さい。筆者ら^{37,38)}は直径 $7\mu\text{m}$ 、長さ 3mm の1本のカーボンファイバーを作用電極とす

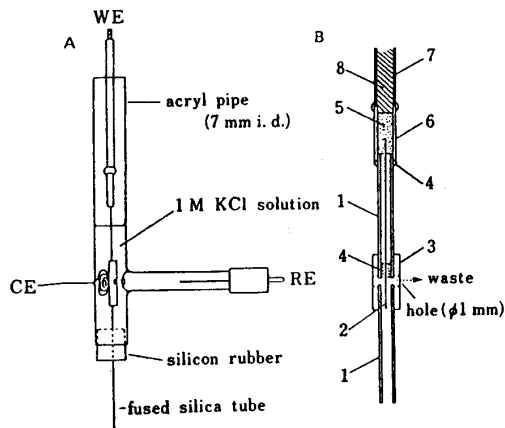


Fig. 13 Structure of micro tubular type cell with a single carbon fiber working electrode. 1= Fused silica tube (50 μm i. d.), 2= carbon fiber (7 μm diameter), 3 =PTFE tube, 4 = adhesive resin, 5=carbon paste, 6=glass tube, 7=insulator, 8=electrical wire.

るセル体積の極めて小さい(約 6 nl) Fig. 13 のような管状電解セルを試作し、自製のパーソナルコンピューター制御のボルタンメトリー装置と組合せて、マイクロ HPLC 用電位走査型電気化学検出器として利用した。カテコールアミンおよびそれらの代謝物の 7 成分混合標準溶液を 0.02 μl (各 20ng) をマイクロシリカー ODS 分離カラム(内径 0.35mm, 長さ 5 cm) に注入して得られた三元ボルタモ・クロマトグラムを Fig. 14 A に示す。電位の走査は矩形波ボルタンメトリーによって -0.20V から 0.80V *vs.* Ag/AgCl まで繰り返し行なった。なお、矩形波電圧、ステップ電圧、およびステップ時間としてそれぞれ 30mV, 5 mV, および 68msec を用いた。図中の DHPG, DHBA, および NM はそれぞれ 3,4-ジヒドロオキシフェニールグリコール, 3,4-ジヒドロオキシベンジルアミン, およびノルメタネフリンを表す。Fig. 14B は従来の 0.70V *vs.* Ag/AgCl の定電位検出法で得られたクロマトグラムであり、DHBA と NM はこの分離条件では保持時間がほとんど同じであるため、両者を区別して検出することはできない。しかし、電位走査型検出法では各ピークの純度を知ると同時に各成分を同定することができ、DHBA と NM はそれぞれの酸化電位が大きく異なるため、Fig. 15 に示すように適当な電位でのクロマトグラムをコンピューターにより表示させる

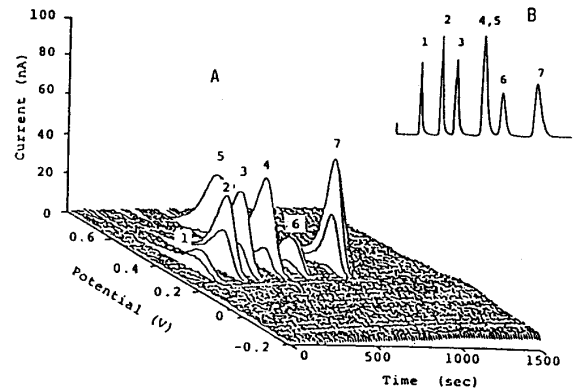


Fig. 14 Comparison of three-dimensional voltammo-chromatogram obtained by scanning electrochemical detector of catecholamines and related compounds with conventional chromatogram. (A) Voltammo-chromatogram with subtracted background currents, (B) conventional chromatogram at a constant potential of 0.70V *vs.* Ag/AgCl. Peaks: 1=DHPG, 2=NA, 3=AD, 4=DHBA, 5=NM, 6=DOPAC, 7=DA.

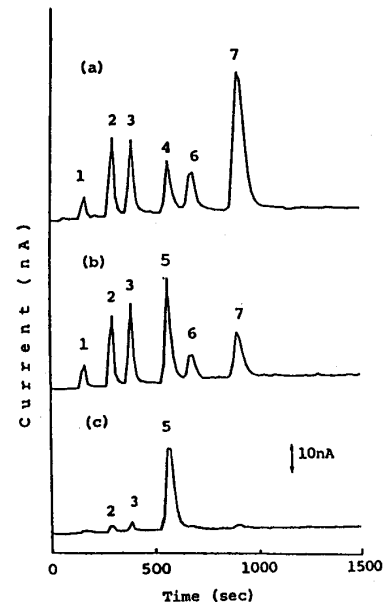


Fig. 15 Reconstructed chromatograms at different potentials in scanning electrochemical detection. Potentials (mV *vs.* Ag/AgCl): (a) 295, (b) 555, (c) 725. Other conditions are the same as in Fig. 14.

ことによって同時定量することが可能である。

Jorgenson ら^{39~41)}は顕微鏡下で直径 $9\ \mu\text{m}$ のカーボンファイバーを内径 $15\ \mu\text{m}$ の中空キャピラリーカラム中に挿入して、長さ 0.3mm を作用電極とする階段波ボルタンメトリーによる電位走査型電気化学検出器について検討した。このように電極長さを短くすると $1\text{V}/\text{sec}$ の速度で電位を走査した場合でも液抵抗 (R) に基づく電圧降下 (iR) によるボルタモグラムの歪みがなくなり、階段波ボルタモグラムはS字型となることを確認した。実験終了後、得られた電流データを電位軸に対して微分して表示させることによって、ハイドロキノンに対して 10^{-8}M の検出限界を得た。⁴¹⁾ 最近、彼らはこの電位走査型検出器を中空キャピラリークロマトグラフィーに用い、蛇の個々の脳細胞中の神経伝達物質の分析に応用し、フェムトモル (10^{-15}moles) レベルのドーパミン、セロトニン、チロシン、およびトリプトファンの定量に成功した。⁴²⁾ さらに、この検出器が中空キャピラリークロマトグラフィーのグラジエント溶離にも利用できることを明らかにした。⁴³⁾

最近の半導体技術の著しい発展に伴い、フォトリソグラフィーにより極めて小さな電極が精度よく作製できるようになってきた。末永ら⁴⁴⁾はこの技術を利用してガラス基板上に16本の微小金バンドからなるアレー電極を試作し、薄層電解セルを組み立てた。バンド電極幅は $25\ \mu\text{m}$ で電極間幅も $25\ \mu\text{m}$ であり、マルチポテンシオスタットによってそれぞれの電極に独立に電位を印加し、16個の電位での電流を測定している。電位分解能を上げるために16本のバンド電極に印加する電位を各5回ステップさせることによって計80個の電位での電流を測定して、ボルタモ・クロマトグラムを表示させている。このように、さらにウルトラマイクロ電極作製技術が進歩すれば定電位電解で電位走査型電気化学検出器と同等の情報が荷電電流の影響なしに得られるようになるものと予想される。

5. ミクロ電極を用いるインビボ・ボルタンメトリー

動物の脳組織内の神経伝達物質であるカテコールアミン、セロトニン (5-HT) などの生理活性アミンを “生きている組織内 (*in vivo*)” で “直接 (real time)” に測定するインビボ・ボルタンメトリーは神経化学における極めて有効な研究技術として期待されている。^{45~47)} 筆者ら³⁶⁾ は作用電極として直径 $7\ \mu\text{m}$ のカーボンファイバーをガラスキャピラリーに封入して長さ約 $0.5\sim 1\text{mm}$ の Fig. 16 に示すようなマイクロ電極を試作し、ラット脳内の生理活性アミンのインビボ・ボルタンメトリーのための基礎検討を行なった。作用電極表面は 0.002M 硫酸又は生理食塩水のリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 70Hz の三角波交流を 0V から 3V vs. Ag/AgCl の電位範囲で20秒間印加する電気化学的処理^{48~50)}を施した。このような電解処理をした電極を用い、生理食塩水のリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で DA と DA の先駆体であるチロシン (TYR), DA の代謝物である HVA, およびインドールアミンの 5-HT をそれぞれ共存させた場合に得られたサイクリック半微分ボルタモグラムを Fig. 17A, Fig. 17B, および Fig. 18 に示す。このようにカテコール基を有するものは 0.05V vs. Ag/AgCl 付近に、インドール基を有するものは 0.23V に、メトキシ基を有するものは 0.34V 付近にそれぞれ酸化ピークを示すことが明らかになった。本マイクロ電極による検出

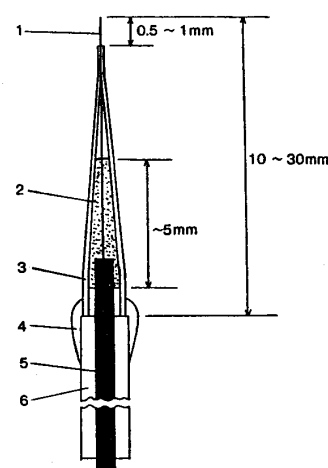


Fig. 16 Structure of a micro carbon fiber electrode for *in vivo* voltammetry. 1=Carbon fiber ($7\ \mu\text{m}$ diameter), 2=carbon paste, 3=glass capillary pipette, 4=Araldite resin, 5=electric wire, 6=insulator.

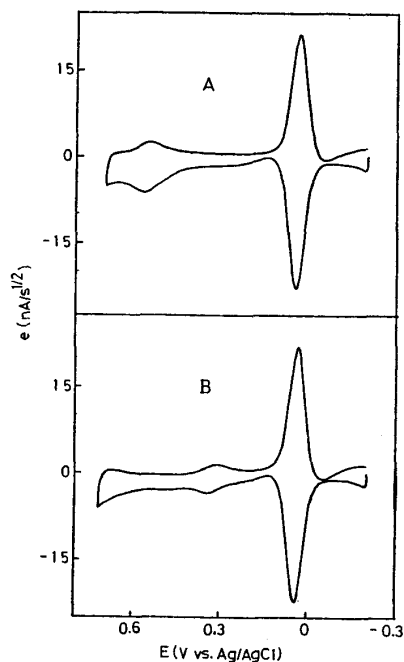


Fig. 17 *In vitro* cyclic semi-derivative voltammograms of mixtures of dopamine and its forerunner or its metabolite in phosphate buffered saline (pH 7.4) with micro carbon fiber electrode (7 μm diameter, ca. 1 mm length). Sample : (A) 10 μM DA containing 10 μM TYR, (B) 10 μM DA containing 10 μM HVA, scan rate : 100 mV/sec.

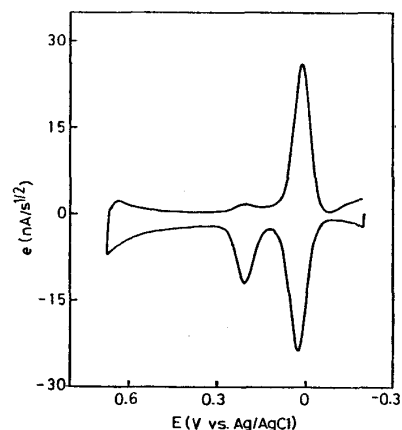


Fig. 18 *In vitro* cyclic semi-derivative voltammogram of the mixture of dopamine and indoleamine with micro carbon fiber electrode. Sample : 10 μM DA containing 1 μM 5-HT. Other conditions are the same as in Fig. 17.

限界は DA で 10^{-7}M , DOPAC で $5 \times 10^{-6}\text{M}$, 5-HT で 10^{-7}M , および 5-HIAA で 10^{-6}M であった。2つのマイクロカーボンファイバー電極をラット脳内の左右の線条体中にそれぞれ挿入し、参照電極 (Ag/AgCl), および対極 (Ag 線) を皮質近くに植込んで、無麻酔、半無拘束状態で測定したサイクリック半微分ボルタモグラムを Fig. 19 に示す。なお、ラット脳内への電極の植込みの様子の一例を Fig. 20 に示す。⁵¹⁾ 左右の線条体とも 0.07V および 0.24V vs. Ag/AgCl 付近に 2つの酸化ピークが観察された。これらのピークはそれぞれ脳内のカテコール類及びインドール類によるものであり、それらの全濃度はいずれも 10^{-6}M オーダであると予想される。

脳構成物質中の生理活性アミン類より 100倍ほど多量に含まれているアスコルビン酸の影響はマイクロ作用電極を上記のような電気化学的前処置を行なうことによって分解能が高まり、ほぼ除くことができる。また、マイクロ作用電極表面を Nafion のような高分子陽イオン交換体で化学修飾したり、^{52,53)}電極表面にアスコルビン酸塩酸化酵素を透析膜によって保持させること⁵⁴⁾によってもアスコルビン酸の影響を除くことができると報告されている。Wightman ら⁵⁵⁾はアスコルビン酸の電気化学的不可逆性を利用して高速ボルタンメトリーによりラット脳内においてカテコールアミンを選択的に検出している。カテコールアミン類はほぼ同一の酸化電位を有しており、ボルタンメトリーではカテコールアミン相互の分離検出が困難である。Wang ら^{56,57)}は通常サイズの作用電極表面をセルロースアセテート膜で被覆したのち、0.007M 水酸化カリウム溶液中に一定時間浸すことによって加水分解して、膜の細孔径を制御することにより、DA を他のカテコールアミン類から分子サイズの差を利用して選択的に検出できることを見出している。この技術をマイクロ電極に採用できればより確度の高いインピボ・ボルタンメトリーが達成されると考えられる。

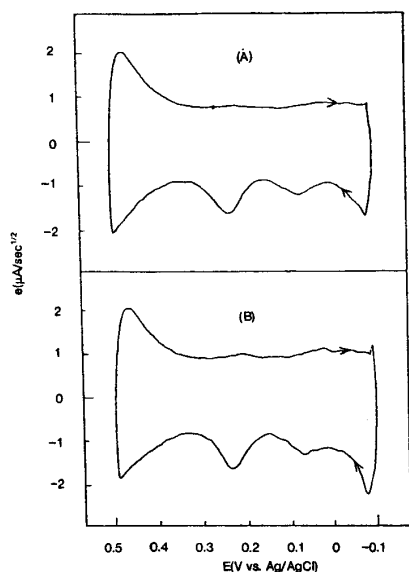


Fig. 19 *In vivo* cyclic semi-derivative voltammograms in the corpus striatum of rat. (A) Left corpus striatum, (B) right corpus striatum.

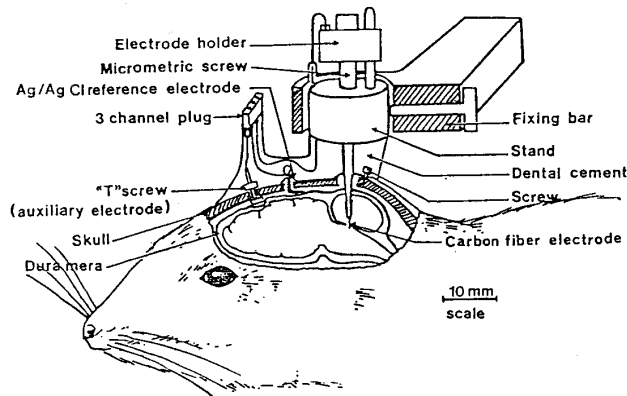


Fig. 20 Schematic description of the implantation of micro carbon fiber working electrode etc. on rat brain.

現在インビボ・ボルタンメトリー用に一般に使用されているマイクロ電極の直径は約 $10\mu\text{m}$ であり1個の細胞内を測定するにはまだ大き過ぎる。最近, Taucら⁵⁸⁾は直径 $5\sim 10\mu\text{m}$ のカーボンファイバーに金属清浄剤を含む亜硝酸ナトリウム液中で交流電圧(50Hz, 2~6V)を印加して強力な電解処理を行なうことによって、直径 $0.4\sim 1.5\mu\text{m}$ のウルトラマイクロ電極を作製した。Ewingら⁵⁹⁾は石英管を加熱して引き伸ばした先端内径が $1\sim 4\mu\text{m}$ 石英キャピラリー内に、メタンガスを通しながら外側から加熱することによってキャピラリー内面に炭素を析出させ、直径 $1\mu\text{m}$ 位のウルトラマイクロリング電極を開発した。阿部ら⁶⁰⁾は独自に $1\mu\text{m}$ 以下の先端径をもつウルトラマイクロ電極を無電解メッキ法により作製している。これらのウルトラマイクロ電極を用いると単一細胞中での測定が可能となり、インビボ・ボルタンメトリーが飛躍的に発展することが期待される。さらに、現在では電極とボルタンメトリー装置の間は電線で結合されており、インビボ・ボルタンメトリーにおいて大きな障害になっているが、最近の無線技術の進歩を考えると、電線なしでボルタモグラムが測定できる日が近い将来に来ることが予期される。

引用文献

- 1) M. Tswett, *Ber. Deutsch. Botan. Ges.*, **24**, 316 (1906).
- 2) D. H. Spackman, W. H. Stein, and S. Moore, *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
- 3) J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 7 (1969).
- 4) C. G. Horvath, B. A. Preiss, and S. R. Lipsky, *Anal. Chem.*, **39**, 1422 (1967).
- 5) D. Ishii, *JASCO Report*, **11** (6), 1 (1974).
- 6) R. P. W. Scott and P. Kucera, *J. Chromatogr.*, **125**, 251 (1976).
- 7) M. Goto and D. Ishii, *J. Electroanal. Chem.*, **61**, 361 (1975).

- 8) P. Dalrymple-Alford, M. Goto, and K. B. Oldham, *J. Electroanal. Chem.*, **85**, 1 (1977).
- 9) P. Dalrymple-Alford, M. Goto, and K. B. Oldham, *Anal. Chem.*, **49**, 1390 (1977).
- 10) M. Goto, M. Kato, and D. Ishii, *Anal. Chim. Acta*, **126**, 95 (1981).
- 11) P. T. Kissinger, *Anal. Chem.*, **49**, 447A (1977).
- 12) D. K. Brunt, *Pharm. Weekb.*, **113**, 689 (1981).
- 13) H. Matsumura and H. Nisino, *Bunseki*, **8**, 555 (1986).
- 14) M. Goto, Y. Koyanagi, and D. Ishii, *J. Chromatogr.*, **208**, 261 (1981).
- 15) Y. Hirata, P. T. Lin, M. Novotny, and R. M. Wightman, *J. Chromatogr.*, **181**, 287 (1980).
- 16) M. Goto, E. Sakurai, and D. Ishii, *J. Liq. Chromatogr. Suppl.*, **6**, 1907 (1983).
- 17) M. Goto, E. Sakurai, and D. Ishii, *J. Chromatogr.*, **238**, 357 (1982).
- 18) M. Goto, G. Zou, and D. Ishii, *J. Chromatogr.*, **268**, 157 (1983).
- 19) M. Goto, G. Zou, and D. Ishii, *J. Chromatogr.*, **275**, 271 (1983).
- 20) W. L. Caudill, A. G. Ewing, S. Jones, and R. M. Wightman, *Anal. Chem.*, **55**, 1877 (1983).
- 21) D. S. Owens, C. M. Johnson, P. E. Sturrock, and A. Jaramills, *Anal. Chim. Acta*, **197**, 249 (1987).
- 22) M. Stastny, R. Volf, H. Benadikova, and I. Vit, *J. Chromatogr. Sci.*, **21**, 18 (1983).
- 23) W. A. MacCrehan, *Anal. Chem.*, **53**, 74 (1981).
- 24) R. Samuelson, J. O'Dea, and J. G. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **52**, 2215 (1980).
- 25) J. Wang, E. Ouziel, and C. H. Yarnitzky, *Anal. Chim. Acta*, **102**, 99 (1978).
- 26) J. J. Scanlon, P. A. Flaquer, G. W. O'Brien, and P. E. Sturrock, *Anal. Chim. Acta*, **158**, 169 (1984).
- 27) P. A. Reardon, G. E. O'Brien, and P. E. Sturrock, *Anal. Chim. Acta*, **162**, 175 (1984).
- 28) M. B. Thomas, H. Msimanga, and P. E. Sturrock, *Anal. Chim. Acta*, **174**, 287 (1985).
- 29) D. S. Owens and P. E. Sturrock, *Anal. Chim. Acta*, **188**, 269 (1986).
- 30) R. E. Panger and P. J. Elving, *Electrochim. Acta*, **20**, 635 (1975).
- 31) C. E. Lunte, S. W. Wong, K. W. Chan, T. H. Ridgway, and W. R. Heineman, *Anal. Chim. Acta*, **188**, 263 (1986).
- 32) C. E. Lunte and W. R. Heineman, *Anal. Chem.*, **59**, 761 (1987).
- 33) C. E. Lunte, J. F. Wheeler, and W. R. Heineman, *Anal. Chim. Acta*, **200**, 101 (1987).
- 34) J. L. Ponchon, R. Cespuglio, F. Gonon, and J. F. Pujol, *Anal. Chem.*, **51**, 1483 (1979).
- 35) M. A. Dayton, J. C. Brown, K. J. Stutts, and R. M. Wightman, *Anal. Chem.*, **52**, 946 (1980).
- 36) M. Goto, "Quantitative Analysis of catecholamines and Related Compounds", Ed. A. M. Krstulovic, Ellis Horwood Ltd., Chichester, pp. 187-208 (1986).
- 37) M. Goto, and K. Shimada, *Chromatographia*, **21**, 631 (1986).
- 38) M. Goto, K. Shimada, T. Takeuchi, and D. Ishii, *Anal. Sci.*, **4**, 91 (1988).
- 39) L. A. Knecht, E. J. Guthrie, and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **56**, 479 (1984).
- 40) J. G. White, R. L. St. Claire III, and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **58**, 293 (1986).
- 41) J. G. White and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **58**, 2992 (1986).
- 42) R. T. Kennedy and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **61**, 436 (1989).

- 43) M. D. Oates and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **61**, 1977 (1989).
- 44) T. Matsue, A. Aoki, E. Ando, M. Narumi, and I. Uchida, Abstract of 40 th ISE Meeting, 928 (1989).
- 45) R. N. Adams, *Anal. Chem.*, **48**, 1128A (1976).
- 46) T. Kakutani, H. Miyazaki, and M. Ikeda, *Bunseki*, **11**, 778 (1986).
- 47) J. A. Stamford, *Trends in Neurosci.*, **12**, 407 (1989).
- 48) F. G. Gonon, C. J. Fombarlet, M. J. Buda, and J-F. Pujol, *Anal. Chem.*, **53**, 1386 (1981).
- 49) M. Ikeda, H. Miyazaki, N. Mugitani, and A. Matsushita, *Neurosci. Res.*, **1**, 171 (1984).
- 50) J-X. Feng, M. Brazell, K. Renner, R. Kasser, and R. N. Adams, *Anal. Chem.*, **59**, 1987 (1987).
- 51) F. Gonon, M. Buda, G. de Simoni, and J-F. Pujol, *Brain Res.*, **273**, 207 (1983).
- 52) G. A. Gerhardt, A. Oke, G. Nagy, B. Moghaddam, and R. N. Adams, *Brain Res.*, **290**, 390 (1984).
- 53) E. W. Kristensen, W. G. Kuhr, and R. M. Wightman, *Anal. Chem.*, **59**, 1752 (1982).
- 54) G. Nagy, M. E. Rice, and R. N. Adams, *Life Sci.*, **31**, 2611 (1982).
- 55) J. A. Stamford, Z. L. Kruk, J. Millar, and R. M. Wightman, *Neurosci. Lett.*, **51**, 133 (1984).
- 56) J. Wang and L. D. Hutchins-Kumar, *Anal. Chem.*, **58**, 402 (1986).
- 57) J. Wang and P. Tuzhi, *Anal. Chem.*, **58**, 3257 (1986).
- 58) A. Meulemans, B. Poulain, G. Baux, L. Tauc, and D. Henzel, *Anal. Chem.*, **58**, 2088 (1986).
- 59) Y-T. Kim, D. M. Scarnulis, and A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **58**, 1782 (1986).
- 60) T. Abe, *Denki Kagaku*, **57**, 1057 (1989).