

② 表紙

題名：パルスレーザーを利用したサンプル DC ボルタンメトリーの開発とグルコースの定量への応用

著者名：新海正也，脇浦征二郎，樋上照男[®]

研究の行われた機関名：信州大学理学部化学科

同所在地：〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1

1. 緒言

固体電極を用いる電気分析化学において、電極表面の汚染を防ぐことは重要な課題である。この問題を解決するために、従来、機械的研磨処理¹⁾、電気あるいは化学的処理²⁾、高周波プラズマ処理³⁾などの活性化法が試みられてきたが、これらの方法には電極を電解セルから一旦取り出して処理を行わなければならない欠点がある。そこで、著者らは固体表面に高いエネルギー密度のレーザーパルス (LP) を照射することにより、その最表面を剥ぎ取るレーザーアブレーション作用を用いて、電極の汚染を防ぎながらボルタモグラムを測定することのできる Laser Ablation Voltammetry (LAV) を開発した^{4) 5)}。

本研究では、従来の LAV を改良し、LP 照射と電位ステップ (PS) を同時に行う Laser Pulse Sampled DC Voltammetry (LPSDCV) を開発した。LP を照射することにより、電極の汚染を防いで再現性のよいボルタモグラム測定を実現するとともに、Sampled DC Voltammetry (Sampled DCV) の電流サンプリング法を活用することにより充電電流の影響を軽減することを目指した。ここでは、電解生成物が電極を汚染しやすいグルコースの酸化反応を取り上げて LPSDCV の諸性能を検討するとともに、この方法を用いて、グルコースよりも電極を汚染しやすいタンパク質を含むウシ血清のグルコースの定量を試みた。

2. 実験

2.1 Laser Pulse Sampled DC Voltammetry (LPSDCV) の原理

Fig. 1 に LPSDCV の原理を示す。通常の Sampled DC Voltammetry (Sampled DCV) では、PS だけを行うのに対し、LPSDCV では PS と同時に LP を電極表面へ照射する。このとき生じる電流はファラデー電流と、PS と LP 照射による充電電流が合わさったものとなる。しかし、充電電流は時間と共に指数関数的に減少するため、PS あるいは LP 照射から適当な時間 (遅延時間, τ_d) 経過した後の電流をサンプリングすれば、充電電流の寄与を軽減することができる。本研究では、PS 幅を 10 mV とした。PS と LP 照射を 2 秒毎に行い、一定の遅延時間において電流をサンプリングし、この電流を電位に対してプロットすることで LPSDC ボルタモグラムを作成した。

2.2 測定装置

Fig. 2 に LPSDCV の装置図を示す。レーザーアブレーション用のパルスレーザーとして、Q スイッチ Nd:YAG レーザー (Quantel 社, Brilliant ω) を使用した。LP の波長は 1064 nm、パルス幅は 5 ns であった。LP の電極付近でのスポット径は約 6 mm で、スポットの位置は、中心が電極 (直径 0.5 mm) の中心に一致するように微動ステージを用いて調整した。

ポテンショスタット（扶桑製作所，HECS 972）による PS と電流サンプリング及び LP 照射は，デジタルユニバーサル信号処理装置（扶桑製作所，HECS 326）を介して，パーソナルコンピュータによって制御した．電流はデジタルデータとしてコンピュータに保存し，表計算ソフトを用いて電流－電位曲線（ボルタモグラム）を作成した．側面に光学窓を取り付けた電解セルを使用した．作用電極はセルの側面から差し込み，LP に対して水平かつ電極表面が光学窓から約 5 mm 離れた位置になるように固定した．作用電極には銅電極を用いた．電極は銅線（ニラコ，純度 99.9 %，直径 0.5 mm）を内径 6 mm のガラス管にエポキシ樹脂で封入して作製した．銅電極は，研磨紙と直径 0.3 μm のアルミナパウダーで研磨後，イオン交換水中で十分に超音波洗浄してから使用した．対極には白金線，参照電極には飽和カロメル電極（saturated calomel electrode, SCE）を用いた．

2.3 試薬

D-(+)-グルコース，ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウムはナカライテスクの特級試薬，水酸化ナトリウムは和光純薬の特級試薬をそのまま用いた．その他の試薬はすべて特級試薬を用いた．実試料として用いたウシ血清は医学生物研究所(株)より購入した．試料溶液の調製及び希釈にはイオン交換水を用いた．

2.4 測定手順

支持電解質は 0.1 mol dm^{-3} の水酸化ナトリウム溶液とした⁶⁾．LPSDCボルタモグラムの測定前には，電極表面を定常的な状態にするため，電極にLPを 20 Hzで 15 秒間照射した後，ブランク溶液（ 0.1 mol dm^{-3} の水酸化ナトリウム溶液）中で 0 - 700 mVの電位走査を 3 回行った．試料溶液のグルコース濃度は， 1.00 mol dm^{-3} のグルコース保存溶液を所定量だけマイクロピペットによってセル中に添加して調整した．測定前には約 15 分間，純度 99 %の窒素ガスを溶液中に通じて溶存酸素を除去し，測定中は溶液の上部に窒素ガスを流して酸素の溶解を防いだ．測定は $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ で行った．

3. 結果と考察

3.1 銅電極でのグルコースの LPSDC ボルタモグラム

銅電極でのグルコースの酸化反応は，クーロメトリーによって求められた反応電子数と電解生成物がギ酸であることから，次式で表される 12 電子反応と報告されている^{7) 8)}．

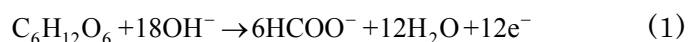


Fig. 3 に銅電極でのグルコースの LPSDC ボルタモグラムを示す．ボルタモグラムは S 字状で，400 - 550 mV の電位範囲で限界電流が見られた．限界電流が反応式 (1) の 12 電子反応に対応すると考えられる．

3.2 最適条件の検討

3.2.1 LPSDC ボルタモグラムに対する Low Pass Filter (LPF) の時定数の影響

本実験では電極表面に LP を照射するために大きな電流の変動が発生する．これを軽減するため，デジタルユニバーサル信号処理装置の LPF の時定数を適切に調整する必要があった．時定数が 0 ms では電流の変動が大きかったが，2 から 200 ms の間では変動は小さく，同様のボルタモグラムを得ることができた．このことから，最適な時定数として 20 ms を採用した．

3.2.2 LPSDCボルタモグラムに対する遅延時間 τ_d の影響

Fig. 4 にLPSDCボルタモグラムに対する遅延時間の影響を示す．この図から分かるように，遅延時間が短くなるに従い，ボルタモグラム全体にわたって，電流が増大した．この電流の増大は主に時定数 (20 ms) によるものと考えられる．実際，時定数を 0 msにしたところ，50 ms程度の遅延時間でグルコースの酸化波が現れない電位領域 (0 - 250 mV) の電流はほとんどゼロとなった．0 - 250 mVの電流を外挿して補正した限界電流を各遅延時間で比較すると，50, 100, 200, 500 msでの限界電流は 1000 msに比べ 1.73, 1.12, 1.04, 1.04 倍となった．また，50 msの遅延時間では電流の変動が大きく限界電流が明瞭でないこともあったが，100 ms以上では限界電流は明瞭でその値はグルコース濃度に比例した．白金電極でのフェロシアン化物イオンの酸化反応に対するLAVにおいて，短い遅延時間の限界電流が長い遅延時間に比べて数倍増大することを示したが⁴⁾，銅電極でのグルコースの酸化反応に対しては遅延時間による限界電流の増大はあまり顕著ではなかった．このことから，銅電極におけるグルコースの酸化反応は物質輸送よりもむしろ表面反応によることが示唆される．遅延時間をどのように設定しても限界電流があまり増大しなかったことから，最適な遅延時間として電流の変動が小さい 1000 msを採用した．

3.2.3 LPSDC ボルタモグラムに対する LP 照射の影響

LP を照射したときと照射しなかったときの LPSDC ボルタモグラムの限界電流を比較したところ，LP を照射することにより限界電流は 1.25 倍増加した．この増加はレーザーアブレーションによる物質輸送の増大のためと考えられるが，上述のように，この反応では物質輸送の寄与は小さいために限界電流の増大があまり期待できないのに加え，1000 ms

の遅延時間では、物質輸送も既に減退していると思われる。一方、最適の LP 強度を決定するために、強度を 40-160 mJ/pulse の範囲で変えてボルタモグラムを測定し、その限界電流値の標準偏差を比較した。標準偏差が最も小さかった強度は 70 - 100 mJ/pulse の間であった。70 mJ/pulse 以下では電極表面の剥離が十分ではなく、剥離が再現性よく行われないうえに大きな標準偏差を示し、逆に 100 mJ/pulse 以上では電極表面が深くかつ不規則に剥離されるために標準偏差が大きくなったと想像される。この結果から、最適の強度を 90 mJ/pulse とした。

3.3 グルコースの濃度依存性

最適条件下での LPSDC ボルタモグラムの限界電流値は、0.2-10 mmol dm⁻³ のグルコースの濃度範囲で、濃度に完全に比例した。(相関係数 0.999) ヒト血清は 3-8 mmol dm⁻³ のグルコースを含むが、ここで得られた結果はヒト血清中のグルコースの定量にも利用できることを示す。グルコース濃度が 4 と 0.4 mmol dm⁻³ の相対標準偏差は、3 回の測定に対して、それぞれ 2.6 と 3.5 % であった。グルコース濃度が 0.2 mmol dm⁻³ での限界電流値の相対標準偏差は 4.2 % であり、これ以下の濃度では相対標準偏差が 5 % を超え、濃度依存性も悪くなった。

3.4 LPSDCV の実試料への適用

LPSDCV を用いてヒト血清と同程度のグルコース濃度をもつウシ血清中のグルコースの定量を試みた。Fig. 5 に標準添加法により得られた LPSDC ボルタモグラムと、添加量と限界電流値の関係を示す。限界電流値は 450 - 550 mV における平均電流値から同電位のブランクの平均電流値を差し引いた値とした。ウシ血清はそのままではタンパク質の妨害が大き過ぎたため、0.1 mol dm⁻³ の水酸化ナトリウム水溶液で 1/10 に希釈して測定に供した。定量の結果、ウシ血清のグルコース濃度は 9.69 ± 0.42 mmol dm⁻³ ($n = 4$) で、相対標準偏差は 3.6 % であった。多量のタンパク質が含まれるウシ血清中にもかかわらず、添加量と限界電流値の関係は、相関係数が 0.997 ± 0.004 ($n = 4$) のよい直線性を示した。このことは、実試料中に電極を汚染しやすいタンパク質が含まれていても本法を適用できることを示すものである。しかし、感度(限界電流値/単位濃度)はウシ血清を含まない場合に比べ約 0.4 倍に低下し、タンパク質の妨害は明らかである。さらに、本実験により得られたグルコースの分析値は試料に添付されていた認証値 (5.3 mmol dm⁻³) の約 2 倍であった。この原因として、血清中に含まれるアスコルビン酸などの酸化やタンパク質による汚染を完全には除去できなかったことが挙げられる。

最後にレーザーアブレーションの汚染防止効果を確認するための実験を行った。ウシ血

清を含むグルコース溶液中において，1つの銅電極では LPSDCV を行い，別の銅電極では非 LP 照射で LPSDCV を行った．この2種類の銅電極で，それぞれ1日5回の測定を6日間続けた．LPを照射しなかった電極では測定を重ねる毎に限界電流は徐々に減少したが，LPを照射した電極では1回目には比較的大きく減少したにもかかわらず，その後ほぼ一定の値を示した．これはレーザーアブレーションによって電極表面の汚染が防がれ，ある一定の電極表面が保たれることを示す．ちなみに，LPを照射した電極では30回目のボルタモグラムでも限界電流が現れるのに対して，LPを照射しなかった電極では限界電流が全く現れなかった．銅電極は，短期間であれば，グルコースの電極反応に比較的汚染されにくかったため，LP照射の効果はあまり顕著ではなかった．しかし，長期間にわたって連続使用するような場合，LP照射は電極の汚染を防ぎ一定の電極表面状態を保つために有効である．

4. 結言

PSとLPを同時に行い，所定の遅延時間後に電流をサンプリングし，この電流を電位に対してプロットして電流－電位曲線（ボルタモグラム）を測定する Laser Pulse Sampled DC Voltammetry (LPSDCV) を開発した．この方法はレーザーアブレーションにより電極の汚染を防ぐだけでなく，充電電流の影響を軽減し，再現性のよいボルタモグラム測定を可能にした．時定数，遅延時間，LP強度などの最適条件下では， $0.2 - 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ の濃度範囲でグルコースの濃度に比例する検量線を得ることができ，定量下限は 0.2 mmol dm^{-3} であった．LPSDCVを用いて，電極を汚染しやすいタンパク質を含むウシ血清のグルコースの定量を標準添加法により行った．感度（限界電流値/単位濃度）は低下し，アスコルビン酸やタンパク質などの妨害のために分析値は認証値に比べ大きな値を示したが，添加量と限界電流の関係はよい直線性を示した．電極の最表面だけを剥離するために，レーザーアブレーションのより精密な制御が今後の課題と考えられる．

文献

- 1) G. N. Kamau, W. S. Willis, J. F. Rusling : *Anal. Chem.*, **57**, 545 (1985).
- 2) M. E. Rice, Z. Galus, R. N. Adams : *J. Electroanal. Chem.*, **143**, 89 (1983).
- 3) J. F. Evans, T. Kuwana : *Anal. Chem.*, **51**, 358 (1979).
- 4) T. Hinoue, I. Watanabe, H. Watarai : *Chem. Lett.*, **1996**, 329.
- 5) T. Hinoue, N. Kuwamoto, I. Watanabe : *J. Electroanal. Chem.*, **466**, 31 (1999).
- 6) M. Chikasou, T. Hirabayashi, T. Nakamura, T. Hinoue : *Anal. Sci.*, **20**, 1171 (2004).
- 7) S-I. Mho, D. C. Johnson : *J. Electroanal. Chem.*, **500**, 524 (2001).
- 8) M. Z. Luo, R. P. Baldwin : *J. Electroanal. Chem.*, **387**, 87, (1995).

⑥ 図の表題と説明

Fig. 1 Principle of laser pulse sampled DC voltammetry

(A) potential step and laser pulse irradiation, (B) current at each potential step and laser pulse irradiation, and (C) laser pulse sampled DC voltammogram.

Fig. 2 Schematic diagram of the experimental setup for laser pulse sampled DC voltammetry

Fig. 3 Laser pulse sampled DC voltammograms for electrooxidation of glucose at the Cu electrode

τ_d , 1000 ms; time constant, 20 ms; laser pulse intensity, ca. 90 mJ/pulse; supporting electrolyte 0.1 mol dm⁻³ NaOH.

Fig. 4 Effect of the delay time (τ_d) on laser pulse sampled DC voltammogram

Concentration of glucose, 0.4 mmol dm⁻³; time constant, 20 ms; laser pulse intensity, ca. 90 mJ/pulse; supporting electrolyte, 0.1 mol dm⁻³ NaOH.

Fig. 5 Laser pulse sampled DC voltammograms of glucose in bovine serum and the relationship between the added quantity of glucose and the limiting current

τ_d , 1000 ms; time constant, 20 ms; laser pulse intensity, ca. 90 mJ/pulse; supporting electrolyte, 0.1 mol dm⁻³ NaOH. (A) Laser pulse sampled DC (LPSDC) voltammograms: ○, the blank solution (45 cm³ of 0.1 mol dm⁻³ NaOH); △, the blank solution + bovine serum 5 cm³; □, 0.5 mmol dm⁻³ glucose added; ▽, 1.0 mmol dm⁻³ added; ◇, 1.5 mmol dm⁻³ added; +, 2.0 mmol dm⁻³ added. (B) the relationship between the added quantity of glucose and the limiting current in the standard addition method.

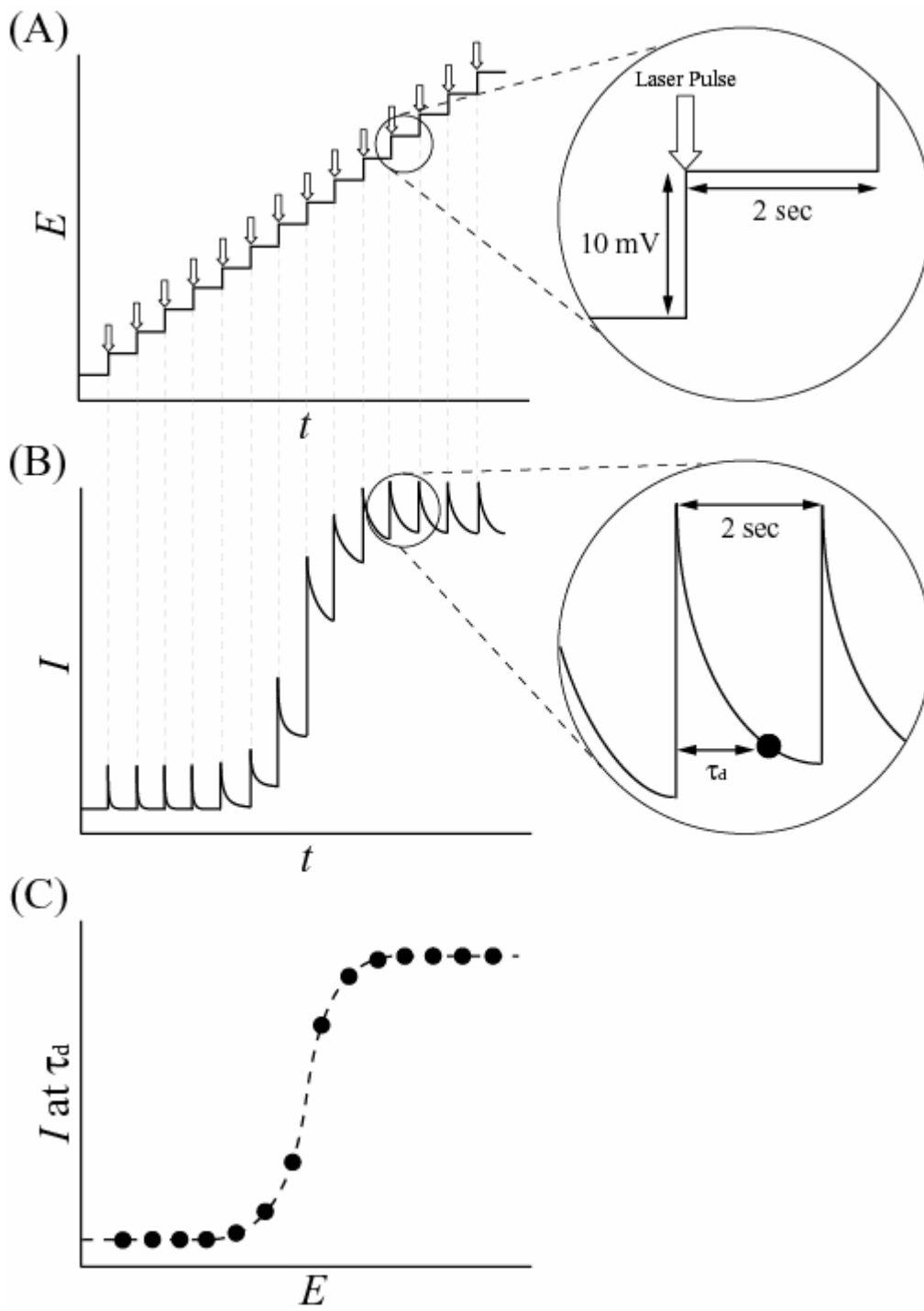


Fig. 1 Shinkai et al.

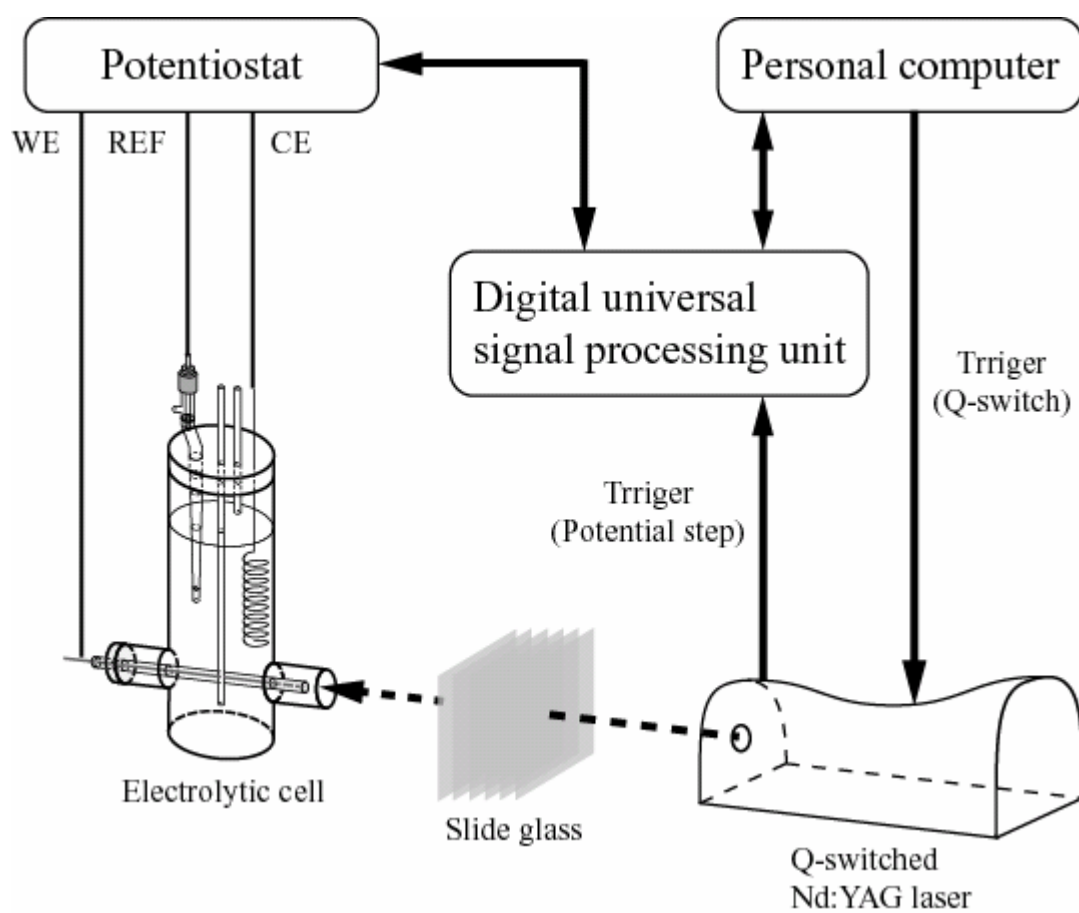


Fig. 2 Shinkai et al.

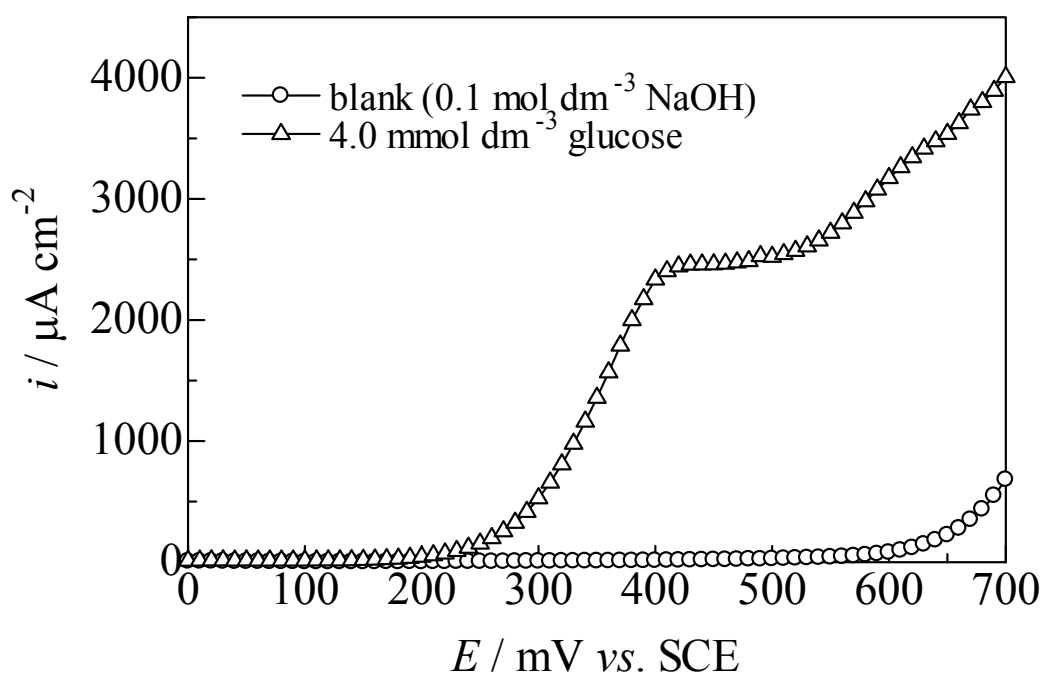


Fig. 3 Shinkai et al.

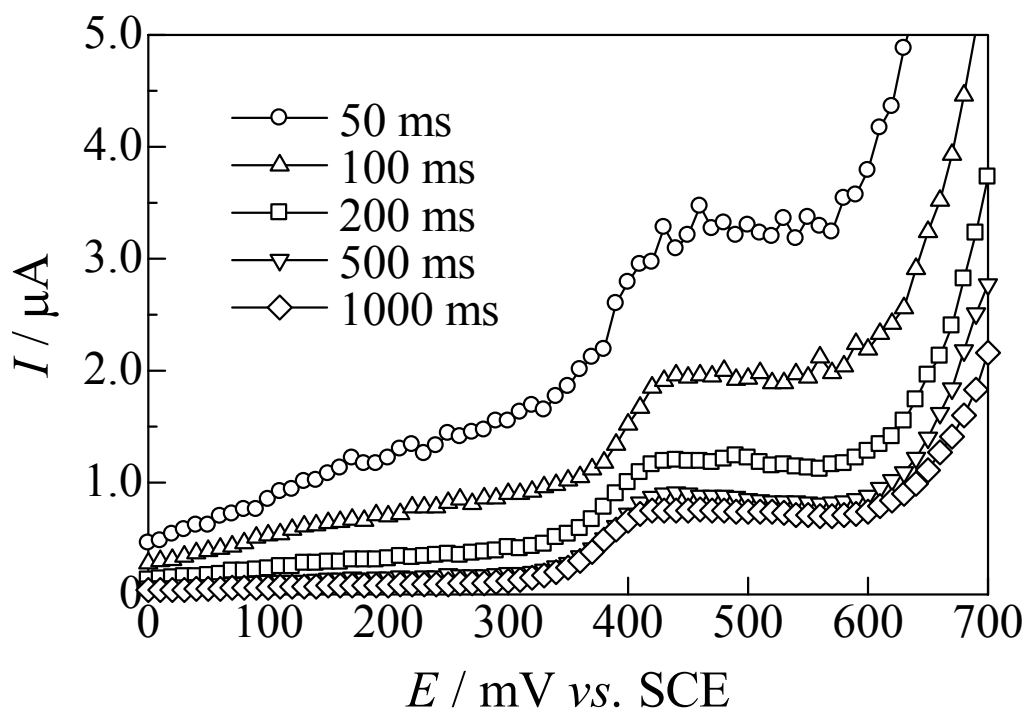
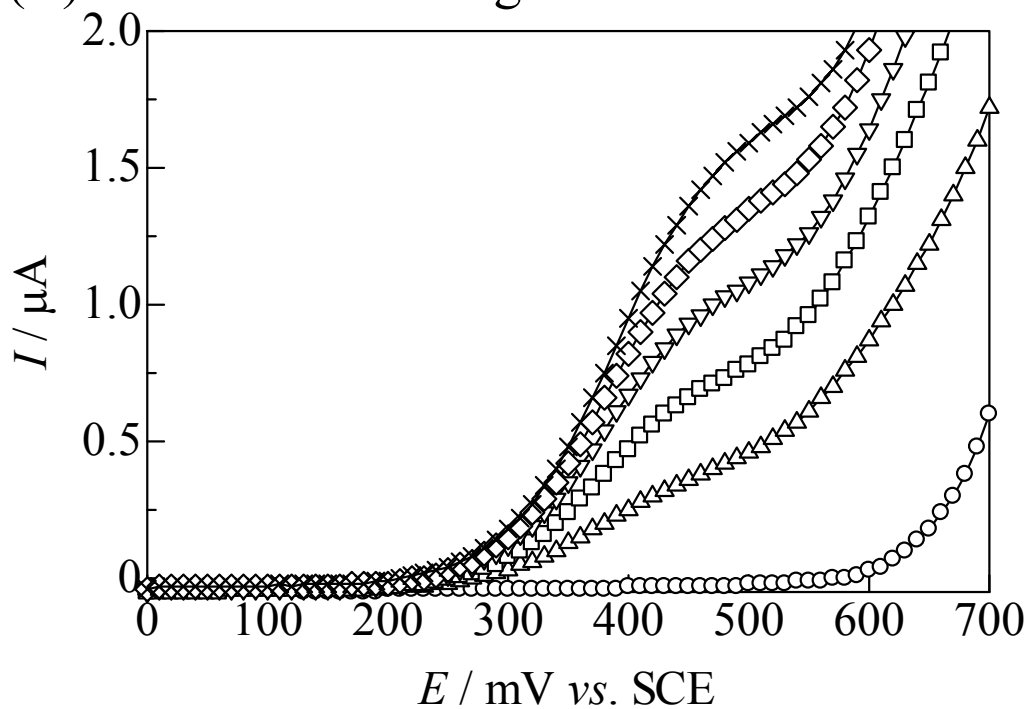


Fig. 4 Shinkai et al.

(A) LPSDC voltammograms



(B) Standard additon

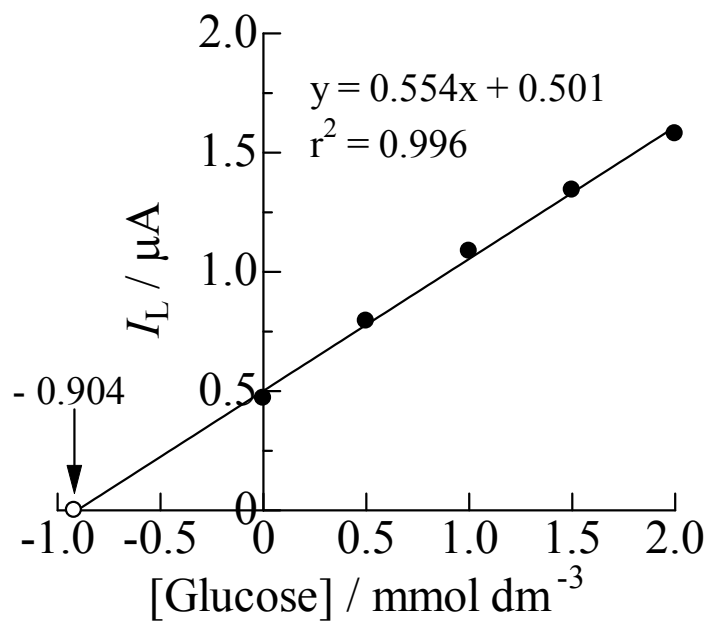


Fig. 5 Shinkai et al.

⑧ 英文要旨

Laser pulse sampled DC voltammetry and its application to the determination of glucose

Masanari SHINKAI, Seijiro WAKIURA, and Teruo HINOUE

Department of Chemistry, Faculty of Science, Shinshu University,

3-1-1, Asahi, Matsumoto-shi, Nagano 390-8621

Electroanalytical chemistry using a solid electrode has been suffering from electrode contamination by various substances contained in a sample solution. In order to remove the contamination and always keep the electrode surface in an active condition, we have developed laser ablation voltammetry (LAV) using an ablation effect of a strong laser pulse. In this study, the LAV was further developed as laser pulse sampled DC voltammetry (LPSDCV) by adopting a current sampling technique of sampled DC voltammetry. The current is sampled at a certain time delayed from the laser pulse irradiation or the potential step and the currents are recorded as a function of the potential to construct a voltammogram. LPSDCV was applied to the determination of glucose with a copper electrode. Under the optimal conditions for the time constant, the delay time, and the pulse energy, a well-defined voltammogram with a limiting current was obtained, and the limiting current was proportional to the glucose concentration from 0.2 to 10 mmol dm⁻³ with the correlation coefficient of 0.999. Further, the determination of glucose in bovine serum containing a large amount of protein was attempted by the standard addition method. The relationship between the added quantity of glucose and the limiting current showed a straight line even in the bovine serum, although the analytical value was ca. 2 times larger than the certified value. The reason is assumed to be due to interference of ascorbic acid and protein contained in the bovine serum.

Keywords: laser ablation; sampled DC voltammetry; glucose; copper; bovine serum.