

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410150

研究課題名(和文) タンデム型液液界面薄層電解セルの開発と微量混合試料の絶対定量への応用

研究課題名(英文) tandem-type thin layer-electrolytic flow cell for absolute determination of ions in mixed solution

研究代表者

吉田 裕美 (Yoshida, Yumi)

京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授

研究者番号：40314306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が開発してきた液液界面薄層電解セルを2つ連結させたタンデム型薄層電解フローセルを開発し、これを質量分析の前段階に設置することで、「分離」「絶対定量」「定性分析」をワンフローで実現できるシステムを目指した。フローセルを二つ連結させ、上流を分離セル、下流を検出セルとし、2種類のイオンを含む混合溶液を注入することによって、分離度、電解効率を調査した。その結果、上流の分離セルでは、電位操作によるイオン分離が、下流の検出セルでは、検量線を用いることなく絶対定量することが出来た。両者を組みあわせることによって、複数イオンの分別絶対定量を実現した。

研究成果の概要(英文)：We developed a tandem-type thin layer-electrolytic flow cell, which realizes "separation", "absolute determination", and "qualitative analysis" in one flow by installing it in the stage prior to mass spectrometry. The two flow cells were connected each other. One cell in upstream was one for separation, and the other cell in downstream for coulometric determination. We investigated the degree of separation and electrolysis efficiency by injecting a mixed solution containing two kinds of ions. As a result, ionic separation was realized by controlling the applied potential in the upstream cell, and coulometric determination was achieved in the downstream cell. The proposed tandem-type thin-electrolytic flow cell made it possible simultaneous absolute determination of multi ions in mixed solution.

研究分野：電気分析化学

キーワード：絶対定量 クーロメトリー イオン 液液界面 電解抽出 イオン分離

1. 研究開始当初の背景

血液や細胞などの生体試料の分析法として、プロテオーム、メタボローム解析などが積極的に展開されているが、これらで測定される微量成分は、高純度標準物質を手に入れることが難しく、通常分析法のように検量線を作成することができない。したがって、トレーサビリティが確立された方法で評価することが困難となっている。一般的には、ショットガン・プロテオミクスのように、一旦、標準物質が存在する形にまで断片化した後、同位体希釈法などの特別な手段を使って、絶対量を決定している。

電気化学的手法は、ファラデーの法則に基づいて電気量から直接物質量を求めることができる方法であり、同法を利用すれば、検量線を必要としない絶対定量をすることが可能である。これまで、水相と有機相の界面に電位差を印加しながら、イオン性化学種の界面移動を電流として測定する方法、すなわちイオン移動ポルタンメトリーに基づいて、電位操作によって、水相に存在するイオン性化学種全量を有機相に抽出させ、また、抽出されたイオン全量を再び水相に逆抽出できる薄層電解セルを開発した。本電解セルを用いて、イオン抽出時に流れる電流を測定すれば、難酸化還元イオンを絶対定量することができる。

2. 研究の目的

本研究では、微量物質、とくに難酸化還元性の物質の絶対定量法を薄層液液界面電解セルを2つ連結させたタンデム型薄層電解フローセルを開発し、これを質量分析の前段階に設置することで、「分離」「絶対定量」「定性分析」をワンフローで実現できるシステムを構築する。同法を用いて、微量混合試料における絶対定量を実現する。本システムにおいて他の分析法にはない独創的な点は2点ある。1つは、検量線や標準物質を必要としない絶対定量法の部分である。特に、これ

まで開発してきた薄層電解フローセルでは、「絶対定量後試料を損失することなく回収できる」という、他の電解フローセルにはない利点を有している。この利点を最大限に生かし、質量分析の前段階に組み込むことで、質量分析では得ることが困難な物質の情報を獲得できると考えている。もう一点は、分離部における電位変調クロマトグラフィーの原理である。電位操作で分配比を自在に変化させながら分配クロマトグラフィーを行う。このような原理に基づくクロマトグラフィーは、現在報告されていない。従来の分離カラムと異なり、液性を変化させなくてもグラジエント分析に類似した効果を何度も繰り返すことができる。

3. 研究の方法

(1) 液液界面薄層電解フローセル

液液界面電解セルの構造を、Fig. 1 に示した。水相用電極として Ag/AgCl 電極を用いた。有機相用電極としては、導電性高分子である poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) を白金板に析出させた電極を用いている。ポリエステルスペーサー(厚み 50 μm)に直線状の流路(2 mm × 1.9 cm)を形成することで厚みを 50 μm に制御した水相を形成した。有機相は厚さ 30 μm のテフロン多孔質膜に支持電解質を含む *o*-nitrophenyl octyl ether (NPOE) を含浸させることで形成した。電解セルは Ag/AgCl 電極と白金電極の間に水相用の流路を形成したスペーサーと NPOE を含浸させたテフロン多孔質膜を挟み込ん

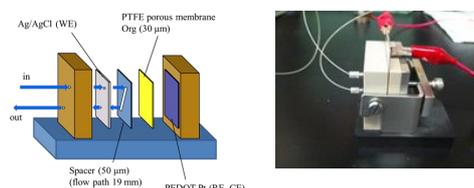


Fig. 1 Construction of the thin-layer flow cell.

だ積層構造になっており、両端を PEEK 材の板で挟み込み、中央一点のねじ止めにより固定されている。同セルは 2 電極式で、各相に挿入した電極は参照電極及び対極として機能する。

Bis(triphenylphosphoranylidene)ammonium tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borate (BTBBA⁺TFPB⁻) を支持電解質として含む NPOE 中で、において PEDOT-Pt の電極反応は Eq. (1) で表される。ここで、(P)、(NPOE) はそれぞれポリマー中、NPOE 中であることを示す。

$$\text{PEDOT}^+\text{TFPB}^-(\text{P}) + e^- \rightleftharpoons \text{PEDOT}(\text{P}) + \text{TFPB}^-(\text{NPOE}) \quad (1)$$

PEDOT-Pt と Ag/AgCl 間に電位差を印加することによって、Eq. (1) の電極反応と同時に水相に含まれるイオン性物質が水相 | NPOE 界面を移動する。この移動に伴って流れる電流を検出し、移動量から物質量を見積もることにより絶対定量を行う。

(2) タンデム型液液界面薄層電解フローシステム

液液界面薄層電解フローセルを用いた分離では、マニュアルインジェクターと 2 つの薄層電解セルを PEEK チューブで連結させて測定を行った (Fig. 2)。1 つ目のセルを分離部、2 つ目のセルを検出部とした。パソコン制御ポテンショスタットを、分離部および検出部の電解セルにそれぞれ接続した。マイクロインジェクターから、分析イオンを含む水相 0.50 μL を、2 μL min⁻¹ の流量で流れている水相に注入した。一定電位をかけた分離セル中で目的イオンを NPOE 相に抽出し、次に電位を 0.20 V から -0.30 V まで 0.5 mV s⁻¹ で掃引することで、順次イオンを逆抽出してイオンを分離した。検出部には両イオンが水相から NPOE 相に完全に移動する電位を印加しておくことによって、分離されたイオンの界面移動に伴う電流値を検出した。

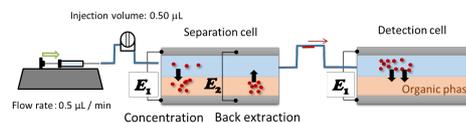


Fig. 2 Tandem system of the thin layer flow cell

4. 研究成果

(1) 薄層電解セルでのイオンの電解抽出

イオンの分離には、液液界面薄層電解セルを PEEK チューブで 2 つ連結することで行った。目的イオンには、疎水性度の異なる 4 級アンモニウムイオンとして tetraethylammonium ion (TEA⁺) と tetrapropylammonium ion (TPA⁺) の塩化物を用いた。Fig. 3 は、TEA⁺ と TPA⁺ がそれぞれ 50 μM 含まれた試料を測定したサイクリックボルタモグラムである。TEA⁺ は 0.10 V 付近、TPA⁺ は -0.10 V 付近に界面移動の電流ピークが現れ、ピーク間の電位差はおよそ 0.2 V であった。

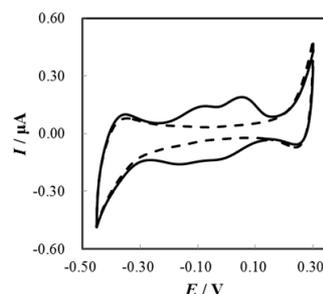


Fig.3 Cyclic voltammogram for 50 μM TEA⁺ and TPA⁺. Scan rate is 10 mV/s

(2) タンデム型フローシステム内の分離セルにおける電位掃引逆抽出

フローセルの水相に 50 μM TEA⁺、TPA⁺ を含む混合試料を 0.50 μL 注入し、流量 2 μL min⁻¹ で、+0.20 V を印加した分離セルへと流した。ここで 0.20 V は、TEA⁺ と TPA⁺ の両イオンが水相から有機相に抽出される電位である。分離セルにおいて、両イオンの水相から NPOE 相への抽出を示す電流ピークが観察された (Fig. 4)。電流ピークの積分値が

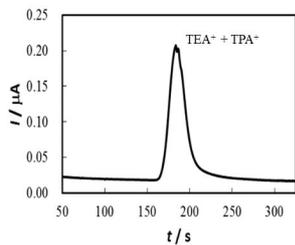


Fig. 4 Peak for the transfers of TEA⁺ and TPA⁺ measured in the separation cell. Concentration of TEA⁺ and TPA⁺ are 50 μM. Applied potential : +0.20 V. Injection volume : 0.5 μL. Flow rate : 2 μL min⁻¹.

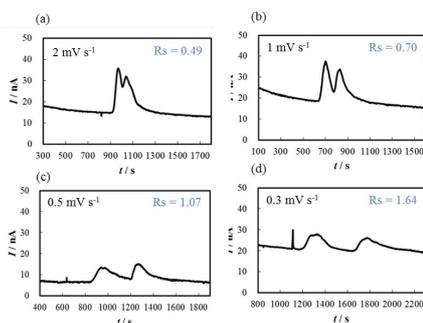


Fig. 5 Separation between TEA⁺ and TPA⁺ by scanning potential of the separation cell from +0.20 V to -0.30 V. Injection volume : 0.5 μL. Flow rate : 0.5 μL min⁻¹. Concentration of TEA⁺ and TPA⁺ are 50 μM. Scan rate (a) 0.3 mV s⁻¹, (b) 0.5 mV s⁻¹, (c) 1 mV s⁻¹, (d) 2 mV s⁻¹

ら電解効率を求めると 116%であり、両イオンが全て NPOE 相中に濃縮されたことが確認された。

0.5 μL min⁻¹ の流量で流しながら、分離セルにて 0.20 V から -0.30 V に電位を掃引した。そのときに、検出セルで得られたクロノアンペログラムを Fig. 5 に示す。掃引速度が遅くなるにしたがって、二つの電流ピークが互いに離れ、分離度が高くなった。測定した 4 つの掃引速度のうち、分離度が良く、掃引速度が速い 0.5 mV s⁻¹ と 1 mV s⁻¹ に関して流量を変化させた。(Fig. 6)。基本的に分離度は流量に大きく左右されなかったが、掃引速度が 0.5、1 mV s⁻¹ の時、流量の最適条件はそれぞれ 2 μL min⁻¹、5 μL min⁻¹ であることが分かった。以下、分離セルの実験条件を 0.5 mVs⁻¹、2 μL min⁻¹ にして測定を行った。

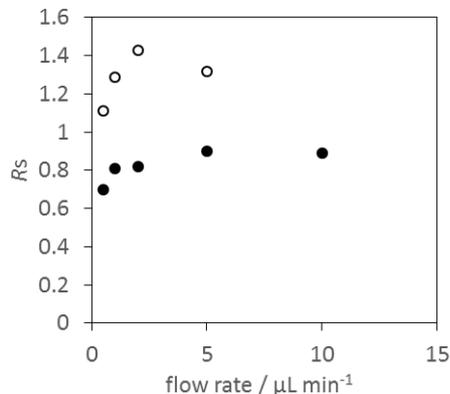


Fig. 6 Dependence of degree of separation on flow rate in the separation cell by scanning the applied potential from 0.20 V to -0.30 V at scan rate of 0.5 mV min⁻¹ (○) or 1 mV min⁻¹ (●). Injection volume: 0.5 μL. Flow rate : 0.5 μL min⁻¹. Concentration of TEA⁺ and TPA⁺ are 50 μM.

(3) 混合試料溶液中のテトラエチルアンモニウムイオン (TEA⁺) とテトラプロピルアンモニウムイオン (TPA⁺) の分別絶対定量

試料溶液に含まれる TEA⁺ と TPA⁺ の濃度比を変化させて、電流ピークを測定した。目的イオンの全量を 100 μM と固定し、濃度比を TEA⁺:TPA⁺=0:10、2:8、4:6、6:4、8:2、10:0 とした。Fig. 7 は、分離セルと検出セルを 2 つ連結させたシステムにおいて、検出セルで測定されたクロノアンペログラムである。TEA⁺ の濃度を減少させ TPA⁺ 濃度を増加させるにしたがって、早い時間で検出されるピークは減少し、遅い時間

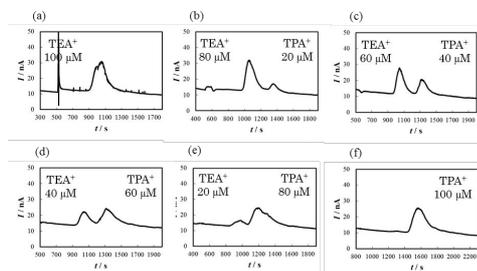


Fig. 7 Separation between TEA⁺ and TPA⁺ by scanning potential of the separation cell from +0.20 V to -0.35 V. Injection volume: 0.5 μL. Scan rate : 0.5 mV s⁻¹. Flow rate : 2 μL min⁻¹. Ratio of concentration, TEA⁺ : TPA⁺ = (a) 10 : 0, (b) 8 : 2, (c) 6 : 4, (d) 4 : 6, (e) 2 : 8, (f) 0 : 10.

Table Coulometric determination of tetraethylammonium ion (TEA) and tetrapropylammonium ion (TPA) in sample solution of 1 μ L

Sample	Original / pmol		Found / pmol (ϵ / %) ^a	
	TEA	TPA	TEA	TPA
1	100	0	83.0 (83)	-
2	80	20	57.6 (72)	21.2 (106)
3	60	40	53.4 (89)	40.0 (100)
4	40	60	33.2 (83)	52.2 (87)
5	80	20	16.6 (83)	68.0 (85)
6	0	100	-	99.0 (99)

a) ϵ is electrolysis efficiency

に検出された電流ピークは大きくなった。つまり、早い時間で検出される電流ピークは TEA⁺、遅い時間に検出される電流ピークは TPA⁺ に由来するものである。検出セルにて、すべてのイオンを検出した時、それぞれのイオンは再び検出セルの NPOE 相に濃縮されているはずである。水相の流量を 0 にしてサイクリックボルタモグラムを測定したところ、それぞれのイオン濃度比に対応したボルタモグラムが測定された。このことは、分離セルと検出セルで定量的に抽出・逆抽出が実現し、試料が消失しないを示している。電流ピークの電解効率を Table 2 に示す。先行ピークである TEA⁺ では、テーリング部分をベースラインに合わせて補正を行っているため、若干値が小さくなっているが、それぞれ 100% に近い値が得られ、分別絶対定量が達成された。同電解セルは、質量分析計と接続可能であるため、「分離」「定量」「定性」がワンスルーで実現できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

K. Murakami, K. Hori, K. Maeda, M. Fukuyama and *Y. Yoshida, Distribution and adsorption of ionic species into a liposome membrane and their dependence upon the species and concentration of a coexisting counterion, *Langmuir*, 32 (2016) 10678-10684. 査読有
DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b03162

*吉田, イオンの電解溶媒抽出, *海洋化学研究*, 28 (1), 30-35 (2015). 査読無

*吉田, 液液、液膜界面でのイオン分配に関する電気分析化学的研究, *Review of Polarography*, 61(1) 3-10 (2015). 査読無
DOI: 10.5189/revpolarography.61.3

*Y. Yoshida, J. Uchida, S. Nakamura, S. Yamaguchi and K. Maeda, The improved thin-layer electrolysis cell for ion transfer at the liquid|liquid interface using a conducting polymer-coated electrode, *Anal. Sci.*, 30 (3) 351-357 (2014). 査読有
DOI: 10.2116/analsci.30.351

*吉田, 「イオン選択性電極」, *ぶんせき*, 8, 416-421(2014). 査読無

他 2 件

〔学会発表〕(計 17 件)

Y. Yoshida, M. Fukuyama, K. Maeda, Conducting polymer-coated electrode and its application to the thin layer electrolysis cell for coulometric determination, PITTCON 2016, in Atlanta, U.S.A (2016)

Y. Yoshida, J. Uchida, K. Hosoya, K. Maeda, Electrolytic extraction of ionic species using the thin layer electrolysis cell for the ion transfer at the liquid|liquid interface, the International Chemical Congress of Pacific Basin Countries (Pacifichem 2015), in Honolulu, U.S.A (2015)

Y. Yoshida, Distribution equilibrium of ions between an aqueous phase and bilayer lipid membrane, 48nd Heyrovský Discussion, in Prague, Czech Republic (2015)

Y. Yoshida, J. Uchida, S. Nakamura, K. Maeda, The thin layer electrolysis cell with the aqueous and the organic phases and its application to coulometric determination and separation of ions, 2rd Asian Symposium for Analytical Sciences (2015), 九州大学, 福岡

Y. Yoshida, J. Uchida, S. Nakamura, K. Maeda, Improved thin-layer electrolysis cell for ion transfer at the liquid | liquid interface using a conducting polymer-coated electrode, the 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (2015) Lausanne, Switzerland

ほか 12 件

〔その他〕
ホームページ

<http://www.cis.kit.ac.jp/~anallab/AnalChemHP/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 裕美 (YOSHIDA, Yumi)

京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授

研究者番号：40314306

(2)研究分担者

前田 耕治 (MAEDA, Kohji)

京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号：00229303

(3)連携研究者

福山 真央 (FUKUYAMA, Mao)

京都工芸繊維大学・グローバルエクセレンス・助教

研究者番号：40754429

(4)研究協力者

内田 潤也 (UCHIDA, Junya)

中村 祐依 (NAKAMURA, Yui)

日下部 瑛美 (KUSAKABE, Emi)