

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05543

研究課題名(和文)革新的な低容積全電解アレーセルを用いるモノアミンの高速オンライン分離分析

研究課題名(英文)High-speed online separation analysis of monoamine using an innovative low-volume coulometric array cell

研究代表者

水口 仁志(MIZUGUCHI, Hitoshi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・准教授

研究者番号：30333991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トラックエッチ膜フィルター電極を用いて、低容積の全電解アレーセルを開発した。本研究で提案する検出器をキャピラリーHPLCに適用したところ、カテコールアミンに対して検量線が不要な電量検出が可能であった。提案するセルを用いた二重電極検出では、低流量かつ低注入量で実施されるキャピラリーHPLCにおいて、ピークが広がることなしに、高い捕捉率を提供した。本研究では、提案するHPLCをマイクロダイアリシスサンプリングシステムと同期させ、自由行動下にあるマウスの脳内での神経伝達物質のリアルタイム測定を通してその有用性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果のもっとも大きな学術的意義は、これまで困難であった全電解アレーセルの低容積化に成功したことと、このような全電解セルがトラックエッチ膜フィルター電極を重ねるだけで容易に作製可能であることを示した点である。これにより、ごく微量の測定試料を対象として低流量で実施されるキャピラリーHPLCにおいて、検量線不要な定量分析が可能となり、さらに二重電極検出において後段の電極からのピークが追加の広がり無しに検出できるようになった。これには、ピークの帰属に関する情報が含まれており、マイクロダイアリシスシステムと同期したHPLCにおいてその動作と有用性が実証された。

研究成果の概要(英文)：We developed a low inner-volume coulometric array cell using track-etched microporous membrane electrodes. Capillary HPLC using this proposed cell as an electrochemical detector enabled calibration-free quantitative analysis of catecholamine. The dual-electrode detection provided high collection efficiency without additional peak broadenings in the capillary HPLC with a low flow rate and low injection volume. The proposed HPLC was synchronized with a microdialysis sampling system to demonstrate in vivo analysis of dopamine in the striatum of a freely-moving mouse.

研究分野：分析化学

キーワード：トラックエッチドメンブレン 高速液体クロマトグラフィー 電気化学検出器 モノアミン in vivo測定 ドーパミン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞外液中のドーパミン、セロトニン、ノルアドレナリンをはじめとする神経伝達物質の動態は認知機能や運動機能と密接に関連していることが知られており、精神障害や運動失調の症状を伴う様々な疾病の機序や投薬の効果を明らかにするためには、可能な限りリアルタイムに近い生きた情報の取得が必要である。電気化学検出器を備えたキャピラリー液体クロマトグラフィーは、微量試料に対応できるだけでなく、細管カラムを用いることによる優れた分離性能とハイスループットという特長を併せ持ち、マイクロダイアリシスとの連携も可能であることから、上記の分析ニーズを満たす有力な手法の一つである。また、複雑な生体マトリックス共存下で目的物質を分離検出するためには、検出器側のアシストも重要である。定量的な電気分解を促す全電解セルは、検量線を必要としない電量検出を可能とするだけでなく、複数の電解セルを直列に配置することによって、物質の酸化還元反応の可逆性に伴う選択性の発現や物質同定を支援する機能を提供する。こうしたコンセプトは古典的な高流量の HPLC では実現され、脳から抽出したカテコールアミンの分離定量に応用された例もある[1]。しかし従来の多孔性電極では電解セルの低容積化に限界があり、微量の試料を対象とするキャピラリー HPLC には適用することができなかった。

一方、マイクロダイアリシスによって連続的に供給される試料は、通常は一定体積あるいは時間ごとのフラクションとして回収され、必要な前処理を施した後に分析されることが多い。しかし、試料保管中の空気酸化等による劣化を回避し、可能な限りリアルタイムに近い情報を提供するためには、サンプリングシステムと分析システムをオンラインで接続して連携させることが望ましい。この際、キャピラリー液体クロマトグラフィーには極めて高いスループットと検出感度が要求され、その性能が時間分解能を決定づける要素となる。従来の流量の大きな HPLC では、ポーラスカーボン電極を直列に接続した ArrayCell を検出器として用いることによって、HPLC-ECD システム全体の性能向上が強くアシストされる。Matson らは 1984 年の時点で、脳から取り出した試料中の 3 種のカテコールアミンの迅速な分離検出を達成している[1]。しかしながら、従来の多孔性電極では全電解の機能を維持したままの低容積化には限界があり、キャピラリー液体クロマトグラフィーと全電解アレー検出のそれぞれの優れた特性を両立した分析システムは実現していなかった。

### 2. 研究の目的

研究代表者はこれまで、トラックエッチ膜フィルター電極とこれを搭載したフロー電解セルの開発に取り組み、流れ条件下で定量的な電気分解が達成されること、フィルター電極の積層によって多電極システムが容易に構築できることを示してきた[2-5]。本研究では、これらの研究で得られた知見に基づき、厚さがわずか 10  $\mu\text{m}$  のトラックエッチ膜フィルター電極の積層によって、従来にない低容積の全電解検出器を着想した。また、これをキャピラリー液体クロマトグラフィーの検出器として適用するとともに、マイクロダイアリシスサンプリングシステムと連携させて、自由行動下にあるマウス脳内ドーパミンの *in vivo* 測定を通して、提案手法の有用性を示すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 低容積全電解セルの開発とキャピラリー液体クロマトグラフィーへの応用

本研究で提案する検出器の構造を図 1 に示す。トラックエッチドメンブレンフィルターを鋳型として作製した電極を、溶離液の流れに沿って、2 つの作用電極と対電極を直列に配置した。各電極の間には、電極同士の短絡を防ぐためのスペーサーを挿入するとともに、溶離液の流れによるフィルター電極の歪みを防ぐために、電極アレーの後段に PTFE 製のラインフィルターが備えられている。参照電極には Ag/AgCl を用い、電極アレーの下流にねじ込み式で設置した。それぞれの電極は、バイポテンショスタット（北斗電工製、HA1010mM2A）に接続した。ここでは、HPLC の検出器として内容積の小さなセルとするために、検出器の入り口の流路内径を 0.1 mm とした。HPLC システムでは、ジーエルサイエンス製 InertSustain C18 カラム（内径 0.7 mm、長さ 50 mm）を用い、VICI 社製インターナルサンプルインジェクタ（試料注入量 0.2  $\mu\text{L}$ ）を用いて、カテコールアミンを含む測定試料を注入した。

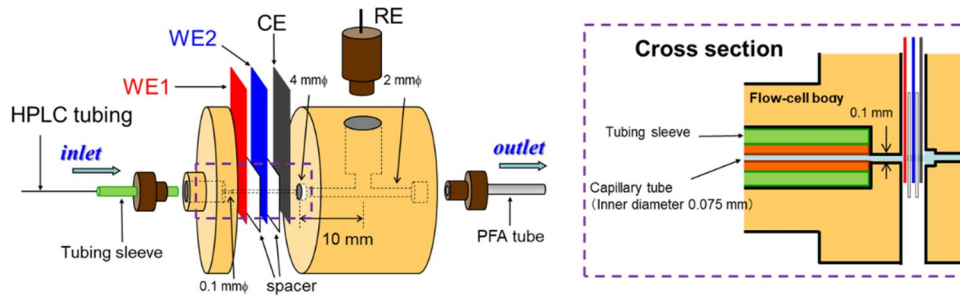


図1 本研究で開発した検出器の概略図．右はフィルター電極の積層部分を拡大したもの．

## (2) マイクロダイアリシシステムとの連携とマウス脳内ドーパミンの *in vivo* 測定

図2に示すように、前記で構築した HPLC システムとマイクロダイアリシシステムを 8 方バルブで接続することで連携させた。シリンジポンプで送り出された灌流液は、C57BL/6 マウスの右線条体に設置された透析プローブへと送られ、脳内でドーパミンを回収した後に 8 方バルブへ到達する。灌流液はシリンジポンプによって連続的に送液されるが、8 方バルブを一定時間ごとに切り替えることで HPLC へ注入される。高濃度のカリウムイオンによる刺激は、6 方バルブを切り替えることによって行われた。HPLC には、ジーエルサイエンス製 InertSustain C18 カラム（内径 0.3 mm、長さ 50 mm）を用い、溶離液流量を 0.03 mL/min とした。

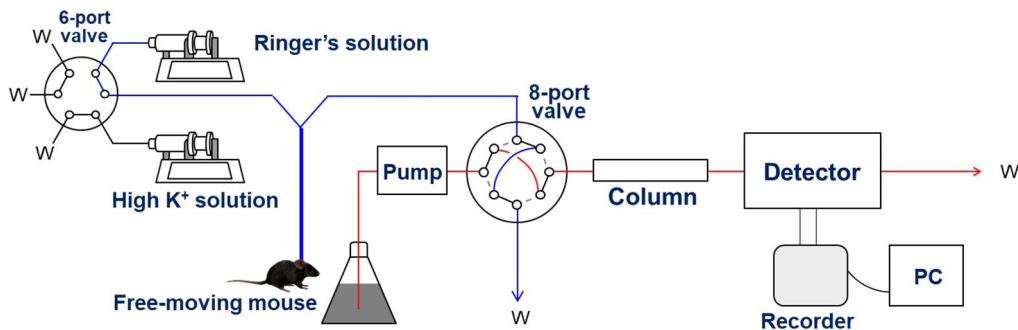


図2 マイクロダイアリシサンプリングシステムと HPLC との連携

## 4. 研究成果

### (1) 低容積全電解セルを検出器とする HPLC の実証

図3に本提案システムで得られた典型的なクロマトグラムを示す。第1電極の電位を 1.0 V、第2電極の電位を 0.2 V とした場合、ノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミンとともに、第1電極でのアノードシグナルと第2電極でのカソードピークを伴って検出された。これは、第1電極での電解生成物が第2電極で還元されることによって得られたものであり、ノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミンの2電子移動を伴う可逆的な電気分解反応特性が反映したものと理解できる。第1電極での電解効率は、電極電位が 0.8~1.0 V のときに2電子反応を基準としてほぼ 100% となり、これよりも高電位側ではさらに高くなった。第1電極と第2電極のそれぞれで得られたピーク面積の比で定義された捕捉率は、第1電極の電位が 1.0 V 以下では最大で 60~70% であり、第1電極の電位が 1.0 V よりも高くなると

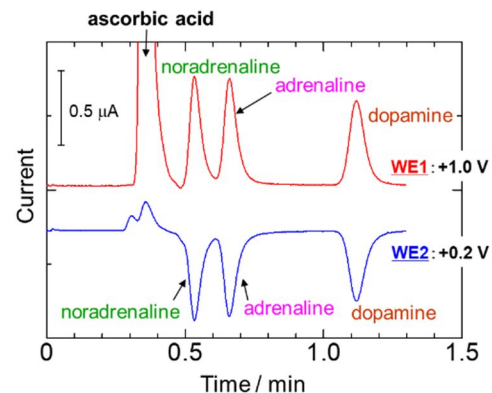


図3 本研究で提案する HPLC システムで得られる典型的なクロマトグラム

著しく減少した（図4）。ここで特筆すべきことは、第1電極で観測されたピークに対して、関連する第2電極でのピークはほぼ遅れ無く観測され、さらにそれらのピーク幅がほぼ等しいことである。これは、第1電極での電解生成物が第2電極の表面に到達する際に、半径方向の拡がりがかクロマトグラムに影響を与えないほどに小さく抑制されていることを示している。このとき、各フィルターを通過するときの電解物質のフラックス面の大きさが電解セルの入り口チャンネルの断面と等しいと仮定すると、1枚の電極を通過するときの内容積は0.08 nLと計算された。2重電極の場合はスペーサーの分を合算すると0.24 nLとなるが、これらは、これまでに提案されてきたフロー電解セルの内容積よりも圧倒的に小さい値である。なお、第1電極で検出されるピークでは検量線の不要な電量検出が成立している。

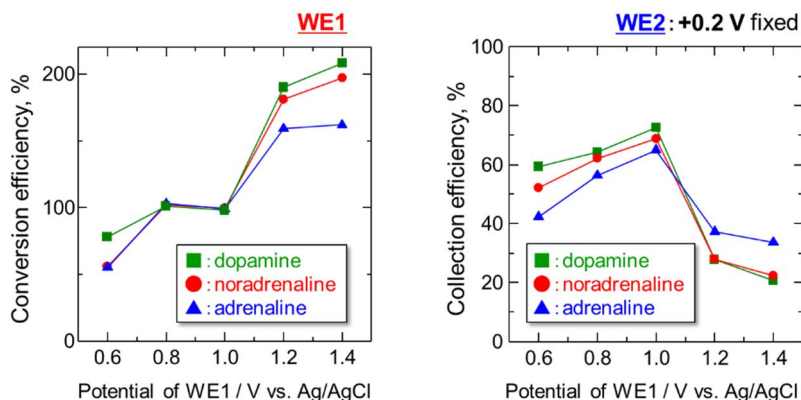


図4 第1電極の電位と電解効率（左）および捕捉率（右）の関係

## (2) マイクロダイアリシスシステムとの連携およびドーパミンの *in vivo* 測定

マイクロダイアリシスと連携させて得られた典型的なクロマトグラムを図5に示す。ここでは灌流液流量を2.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  とし、8方バルブを5分毎に切り替えて測定を行った結果を示している。ドーパミンのシグナルは、バルブを切り替えてから約1.5分で検出された。ここでは電量検出が成立しているため、第1電極で得られたピーク面積は直ちにドーパミン濃度に換算することができる。第2電極ではドーパミンの酸化還元反応の可逆性に対応して、約76%の捕捉率で観測されており、これは標準液を注入した際の値（約72%）に近い値である。このことは、複雑なクロマトグラムの中でも、検出されているピークがドーパミン由来であることを常時確認しながら測定できることを示している。図6はドーパミン濃度の時間変化を示している。透析プローブの設置から約120分でドーパミン濃度が安定化し、高濃度カリウムイオンを含む灌流液の到達に対してドーパミン濃度が素早く応答している様子がわかる。また、この結果は、約9時間にわたる連続運転にも十分に対応できていることを示している。

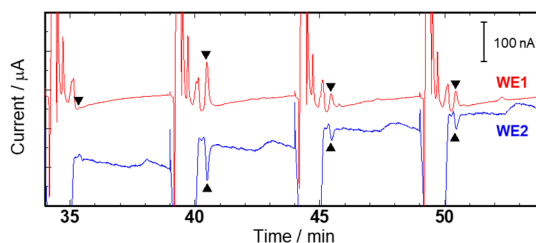


図5 本研究で提案するシステムで得られる典型的なクロマトグラム

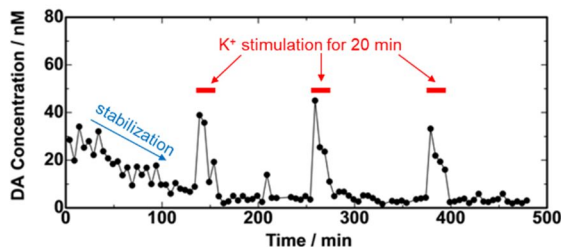


図6 マウス脳内での *in vivo* 測定で観測されたドーパミン濃度の時間変化

以上本研究では、複数の作用電極を搭載した低容積全電解セルを開発し、キャピラリー液体クロマトグラフィーに適用できることを実証し、マイクロダイアリシスサンプリングシステムと連携させたシステムの構築とその動作を確認するとともに、実際にフリームービング状態にあるマウスの線条体内のドーパミン濃度の時間変化測定を実証した。

<引用文献>

- [1] W. R. Matson, et al., *Clin. Chem.*, 30, 1477 (1984).
- [2] H. Mizuguchi, et al., *Talanta*, 96, 168 (2012).
- [3] H. Mizuguchi, et al., *Chem. Lett.*, 42, 1317 (2013).
- [4] H. Mizuguchi, et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 90, 1211 (2017).
- [5] H. Mizuguchi., *J. Flow. Inject. Anal.*, 37, 19 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hitoshi Mizuguchi, Daichi Nishimori, Tomohiko Kuwabara, Masaki Takeuchi, Masamitsu Iiyama, Toshio Takayanagi	4. 巻 1102
2. 論文標題 Track-etched membrane-based dual-electrode coulometric detector for microbore/capillary high-performance liquid chromatography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 46-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aca.2019.12.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西森大地, 桑原知彦, 竹内政樹, 飯山真充, 高柳俊夫, 水口仁志
2. 発表標題 トラックエッチ膜フィルター電極を用いるHPLC-電気化学検出によるカテコールアミンのクーロメトリー検出
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水口仁志, 西森大地, 桑原和彦, 竹内政樹, 飯山真充, 高柳俊夫
2. 発表標題 トラックエッチ膜フィルター電極を搭載した低容積フロー電解セルを用いるHPLC-電気化学検出
3. 学会等名 第26回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川起人, 佐藤采, 岩本緋天, 笠原二郎, 竹内政樹, 飯山真充, 高柳俊夫, 水口仁志
2. 発表標題 小透析法-キャピラリーHPLC-トラックエッチ膜フィルター電量検出装置の開発と脳内ドーパミンのin situ測定
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 次田宗平, 小川起人, 佐藤采, 岩本緋天, 笠原二郎, 竹内政樹, 飯山真充, 高柳俊夫, 水口仁志
2. 発表標題 トラックエッチ膜フィルター二重電極を検出器とする微小透析法-HPLCによるドーパミンのin vivo測定
3. 学会等名 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hitoshi Mizuguchi
2. 発表標題 Electrochemical detection systems fabricated using track-etched microporous membrane filters
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (MRM 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi Nishimori, Tomohiko Kuwabara, Masaki Takeuchi, Masamitsu Iiyama, Toshio Takayanagi, Hitoshi Mizuguchi
2. 発表標題 Determination of catecholamines by HPLC-coulometric detection using track-etched microporous membrane electrodes
3. 学会等名 RSC-Tokyo International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学理工学部 分析・環境化学B-1講座  
<https://www.chem.tokushima-u.ac.jp/B1/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	笠原 二郎  (KASAHARA Jiro)  (10295131)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・准教授    (16101)	
研究協力者	竹内 政樹  (TAKEUCHI Masaki)  (10457319)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・准教授    (16101)	
研究協力者	高柳 俊夫  (TAKAYANAGI Toshio)  (50263554)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・教授    (16101)	
研究協力者	飯山 真充  (IIYAMA Masamitsu)	野村マイクロ・サイエンス株式会社	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関