

回転円盤グラッシーカーボン電極を用いた微分パルス ボルタンメトリーによる薬物の高感度定量

高村喜代子[®], 井上 哲, 今枝 慶一,

菊地 貢, 楠 文代*

(1986 年 7 月 9 日受理)

回転円盤グラッシーカーボン電極を用いた微分パルスボルタンメトリーによりクロルプロマジン, ノルアドレナリン, ビタミン K_3 , マイトマイシン C の高感度定量を行った. 定量の感度並びに再現性の向上のため, グラッシーカーボン表面に 0.5 mol dm^{-3} リン酸塩緩衝液中, 1.6 V vs. 銀/塩化銀電極で 2 分間定電位電解による陽極酸化処理を施し, 更に測定時に 2500 rpm の速度で電極を回転させた. パルス間隔 2 秒, パルス振幅 50 mV , 電位走査速度 5 mV s^{-1} で微分パルスボルタモグラムの測定した. ピーク電流値と薬物濃度との間に, クロルプロマジンとノルアドレナリンについて $5.0 \times 10^{-8} \sim 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, ビタミン K_3 とマイトマイシン C について $5.0 \times 10^{-9} \sim 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ の範囲で直線関係が成立し, その相対標準偏差は 4.0% 以内であった. 検出限界はクロルプロマジンとノルアドレナリンについて $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, ビタミン K_3 とマイトマイシン C について $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ であった.

1 緒 言

ボルタンメトリーをはじめとする電気化学分析法は, その操作法が比較的簡単なこと, 測定対象が電気化学的に活性な物質に限定され選択性及び感度が高いことなどの特徴を有する. そのため, これまでにカテコールアミン, ステロイドホルモン, 抗生物質, 精神安定薬などの定量への応用が試みられてきた^{1)~3)}. これらの薬物の血中有効濃度はおおむね $10^{-6} \sim 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ の範囲である. 近年ドラッグレベルモニタリングが盛んになり, サンプルの採取量が少量化されるにつれて, より高感度な定量法が必要とされるようになってきた. そこで著者らは, 電気化学分析法によるこれら微量薬物の高感度定量を目指し, 以下の 3 点に着目して改良を試みた.

第 1 は回転円盤電極の利用である. 静止電極に比べ, 回転電極では溶液の対流に伴い電極表面への薬物の移動速度が大きくなるので, 限界電流値の増大と, 感度の向上が予想される. 第 2 は電極表面の改質による作用電極の性能向上である. 先に著者らはグラッシーカーボン (GC) 電極表面をリン酸塩溶液中であらかじめ陽極酸化処理すると, フェノチアジン系精神安定薬の酸化電流値

が著しく増大することを報告した⁴⁾⁵⁾. 同様な酸化電流値増大効果はアドレナリンなどのカテコールアミンに対しても報告されている⁶⁾. 従って薬物の高感度定量に対しても酸化処理電極が有用であろうと期待される. 第 3 は微分パルスボルタンメトリーの利用である. これはボルタンメトリーにおける電極電位の走査時にパルス状の電圧を重ねさせて, パルス前後の電流変化を測定する方法⁷⁾で, 金属イオンなど物質によっては検出限界が $10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ 程度に達する⁸⁾⁹⁾. 本報ではこれら三つの利点を組み合わせて, ボルタモグラムの測定条件を検討し, 微量薬物の定量を試みた.

2 実 験

2.1 試 薬

塩酸クロルプロマジン (CPZ) 及びノルアドレナリン (NA) は Sigma 製, ビタミン K_3 (VK₃, 2-Methyl-1, 4-naphthoquinone) は和光純薬工業製, マイトマイシン C (MMC) は協和発酵工業製をそれぞれ精製せずに用いた. NA 以外の薬物は水に溶かして $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ の溶液を調製し, 適宜希釈して用いた. これらの原液は遮光, 密栓して冷蔵保存した. NA 水溶液は用時調製し遮光して用いた. リン酸水素二ナトリウム, リン酸二水素ナトリウムは市販特級品を用いた.

又本実験で用いた水は, すべて蒸留水を Barnstead 製 NANOpure II にて精製した高純度イオン交換水 (比抵

* 東京薬科大学: 192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

抗 $16.7 \text{ M}\Omega$ 以上) である。

2.2 装置及び操作法

サイクリックボルタンメトリー及び定電位電解には、北斗電工製ポテンショスタット (HA-301 型), ファンクシオンジェネレーター (HB-104 型), 及び横河電機製 X-Y レコーダー (3077 型) を使用した。微分パルスボルタンメトリーには扶桑製作所製ポーラログラフ装置 (312 型), 回転円盤電極法には日厚計測製回転円盤電極装置 (RRDE-1 型) 及びモータースピードコントローラー (SC-5 型) を用いた。回転円盤電極には長さ 13 cm の棒状ステンレス製電極の先端に直径 5 mm の円盤型 GC (東海カーボン製 GC-30s) を銀ペーストで接着し, 側面を熱収縮テフロンチューブにて被覆したものを用いた。対極には金電極を, 参照電極には銀/塩化銀電極を使用した。ボルタモグラム測定及び GC 電極の電解処理時には, 支持電解質溶液として 0.5 mol dm^{-3} リン酸緩衝液 (pH 6.8) を用いた。測定溶液中には精製窒素をあらかじめ十分通気して, 溶存酸素を除去し, 遮光下, 室温でボルタモグラムを測定した。

3 結果と考察

3.1 GC 円盤電極の陽極酸化処理

既報^{4,5)}に述べた条件で GC 電極の陽極酸化処理を行い, 電流感度の増大を図った。すなわち, GC 電極表面を $0.3 \mu\text{m}$ アルミナで研磨した後, 表面を洗浄し, 続いて超音波洗浄器を用いてアルミナ粉末を落とし, 0.5 mol dm^{-3} リン酸塩緩衝液 (pH 6.8) 中において 1.6 V vs. 銀/塩化銀電極の電位で 2 分間定電位電解を行った。これを水洗して作用電極とした。このような処理電極を用いて得た CPZ のボルタモグラムでは, アルミナ研磨のみ行った電極を用いた場合に比べて第一酸化ピーク (サイクリックボルタモグラム上で 0.65 V) の電流値増大が著しい。CPZ の場合と同様の酸化電流値増大効果は NA, VK, 及び MMC においても確認された。

GC 電極表面の陽極酸化処理に伴う酸化電流値の増大は, 電極表面に生成したカルボニル基, カルボキシル基, リン酸基などが薬物の吸着を助長し, あるいは薬物の電極反応を促進するためと考えられる¹⁰⁾。

3.2 GC 円盤電極の回転

円盤状の電極を測定溶液内で回転することにより溶液中から電極表面へ向かう対流を発生させ, 電極に到達する薬物量を増大させて電流感度を高めることができる。Fig. 1 には電極の回転速度と CPZ の酸化電流値との関係をプロットした。電極の回転速度を上げていくとそれに伴って酸化電流値も増大するが, 2000 rpm を越えるとほぼ一定値になることが分かる。この結果から, 以

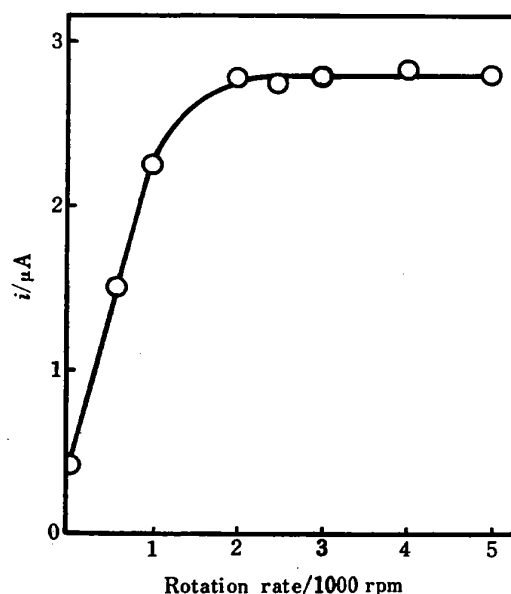


Fig. 1 Effect of rotation rate on the limiting current of $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$

後の測定は電極を 2500 rpm の速度で回転して行うことにした。

3.3 微分パルスボルタンメトリーの利用

表面酸化処理を施した回転 GC 円盤電極を作用電極として微分パルスボルタンメトリーを行い, 電極電位に重畳させるパルスの間隔, パルスの大きさ, 及び電位走査速度を検討した。その結果, パルス間隔は 2 秒が最適であり, これより長いと S/N 比が著しく劣り, 短い場合には感度が低下した。パルスの大きさは 50 mV が適当であり, これより小さいと感度が悪く, 大きいとバックグラウンド電流が大きくなった。又, 電位走査速度は 5 mV/s で最も高い感度が得られた。

3.4 薬物のボルタモグラム

上記 3.1~3.3 において検討した回転陽極酸化処理 GC 電極及び微分パルスボルタンメトリーを用いて, 微量薬物の高感度定量をみた。又, 同時にサイクリックボルタンメトリーを行いこれと比較した。

3.4.1 CPZ のボルタモグラム Fig. 2, A は微分パルスボルタンメトリーで得た $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ の CPZ のボルタモグラムである。 0.53 V にピークを持つ第一酸化波は, CPZ が電極上で 1 電子酸化されて CPZ 陽イオンラジカルを生成する反応に対応する。Fig. 2, B は同濃度の CPZ のサイクリックボルタモグラムである。A のほうが B に比べて著しく高感度に CPZ を検出することができる。サイクリックボルタモグラムにおけ

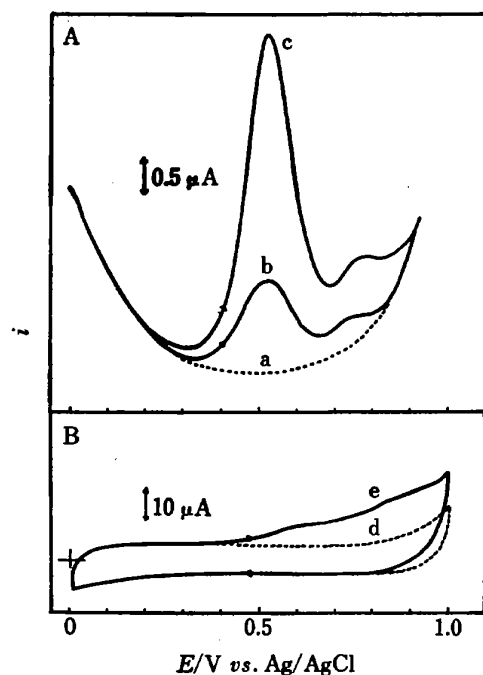


Fig. 2 Differential pulse (A) and cyclic (B) voltammograms of chlorpromazine

Concentration : (a, d) 0; (b) 1.0×10^{-7} ; (c) 4.0×10^{-7} ; (e) 1.0×10^{-6} mol dm $^{-3}$. Scan rate : (A) 5; (B) 100 mV s $^{-1}$

る 0.65 V 付近の第一酸化波は, 微分パルスボルタンメトリーと同じく CPZ の 1 電子酸化反応によるものである. CPZ の酸化により生成した陽イオンラジカルは後続化学反応により CPZ スルホキンド (CPZO) となる. この反応は中性ないしアルカリ性水溶液中で, リン酸イオン, 酒石酸イオンなどの支持電解質イオンにより著しく促進される¹¹⁾. 本実験の測定条件では, CPZ は電極上で酸化されて速やかに最終生成物である CPZO となるため, カソード走査時のサイクリックボルタモグラムには陽イオンラジカルの還元波は見られない.

3.4.2 NA のボルタモグラム Fig. 3, A が NA の微分パルスボルタモグラムである. 0.17 V に NA の酸化ピークが現れる. この場合も Fig. 3, B のサイクリックボルタモグラムに比べて極めて微量の NA を高感度に検出することができる. サイクリックボルタモグラムに見られるノルアドレナリンキノンの還元波 (R_1) は NA の酸化波 (O_1) に比べて小さい. これは, NA の電極反応が Scheme 1 のような複雑な ECEC 機構を含み, 0.17 V 付近で NA が 2 電子酸化反応によりノルアドレナリンキノンとなるが, その一部は後続化学反応によりインドール誘導体となってこの電位付近で還元されないためである.

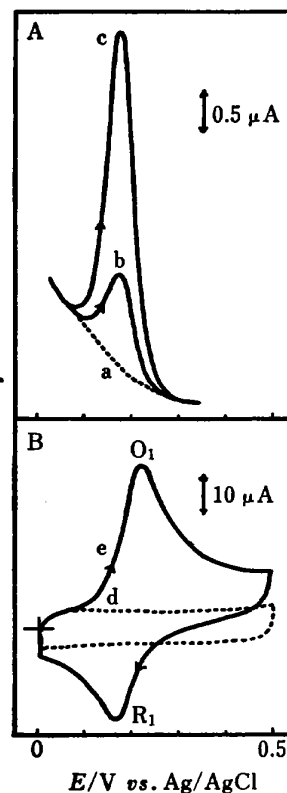
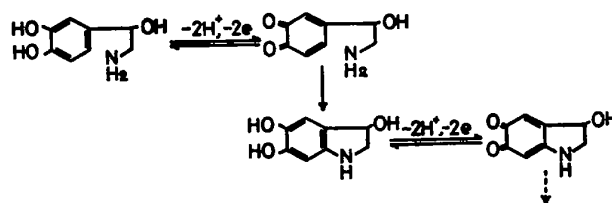


Fig. 3 Differential pulse (A) and cyclic (B) voltammograms of noradrenaline

Concentration : (a, d) 0; (b) 1.0×10^{-7} ; (c) 4.0×10^{-7} ; (e) 1.0×10^{-6} mol dm $^{-3}$. Scan rate : (A) 5; (B) 100 mV s $^{-1}$



Scheme 1

3.4.3 VK₃ のボルタモグラム Fig. 4, A は電位を 0 V から -0.5 V へ走査したときの VK₃ の微分パルスボルタモグラムである. サイクリックボルタモグラム (Fig. 4, B) に比べて極めて高感度であり, 更に CPZ や NA の微分パルスボルタモグラムに比べてピーク電流値が 10 倍ほど大きいことが特徴である. これは後述の MMC と共に薬物の電極反応の可逆性と関係があるものと思われる. CPZ や NA と異なり, Fig. 4, B の VK₃ のサイクリックボルタモグラムには, ほぼ同じ大きさの酸化還元波の対がみられる. これはキノン-ハイドロキノンの可逆的な 2 電子酸化還元反応によるものである. CPZ や NA の場合, 酸化電位付近でパ

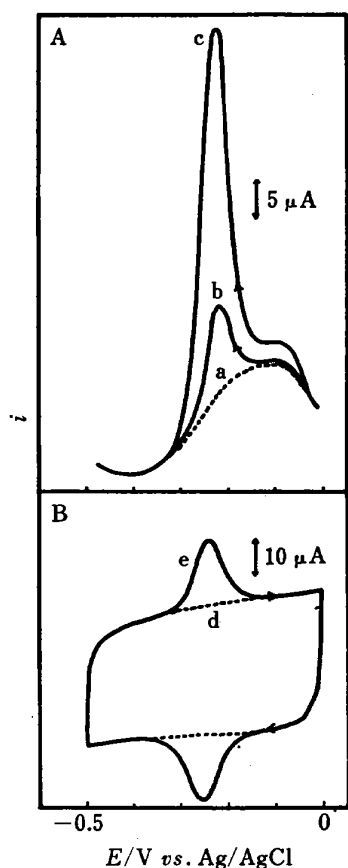


Fig. 4 Differential pulse (A) and cyclic (B) voltammograms of vitamin K_3

Concentration : (a, d) 0; (b) 1.0×10^{-7} ; (c) 4.0×10^{-7} ; (e) 1.0×10^{-6} mol dm^{-3} . Scan rate : (A) 5; (B) 100 mV s^{-1}

ルス状の電位を電極に印加すると、電極近傍の CPZ や NA の酸化体は後続化学反応によって一部消失してしまうが、 VK_3 のように酸化-還元が可逆的で電極反応速度が大きい薬物の場合、パルスの印加・消失に応じて電極表面の薬物の酸化・還元が繰り返されるので、そのため CPZ や NA よりも高いピーク電流値が得られると考えられる。

3.4.4 MMC のボルタモグラム MMC も微分パルスボルタモグラム上の還元波のピーク電流値は CPZ や NA に比べてはるかに大きい (Fig. 5, A). MMC の電極反応も、キノン-ハイドロキノンの可逆的な酸化還元反応である。 VK_3 と同様にほぼ対称な酸化還元波がサイクリックボルタモグラム上に現れる (Fig. 5, B).

3.5 検量線

これらの薬物の定量に対する本法の適用性を検討するために検量線を作成した。微分パルスボルタモグラム上に現れるピーク電流値を種々の薬物濃度で測定し、Fig.

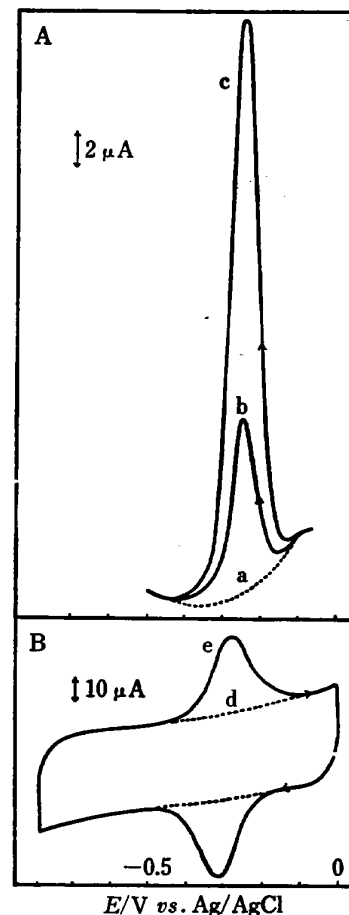


Fig. 5 Differential pulse (A) and cyclic (B) voltammograms of mitomycin C

Concentration : (a, d) 0; (b) 1.0×10^{-7} ; (c) 4.0×10^{-7} ; (e) 1.0×10^{-6} mol dm^{-3} . Scan rate : (A) 5; (B) 100 mV s^{-1}

6a~Fig. 6d を得た。CPZ 及び NA の場合、 $5.0 \times 10^{-8} \sim 5.0 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} (検出限界: 1.0×10^{-8} mol dm^{-3})、可逆的な電極反応を示す VK_3 及び MMC の場合、 $5.0 \times 10^{-9} \sim 5.0 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} (検出限界: 1.0×10^{-9} mol dm^{-3}) において定量が可能であることが分かった。各薬物につき 10 回の反復測定に対する相対標準偏差 (R.S.D.) を図中に記した。

薬物濃度がおおむね 5×10^{-7} mol dm^{-3} を越えると、濃度に対するピーク電流値の上昇率は徐々に低下し、しだいに検量線の直線性が成り立たなくなる。このことは、電極を陽極酸化処理することにより、吸着支配の電流の関与が大なることを示唆している⁵⁾。

4 結 語

カーボン電極の電位窓は中性の支持電解質溶液中で約 $-1 \text{ V} \sim +1.2 \text{ V vs.}$ 飽和カロメル電極という広範囲にわたる。そのため多くの電極活性物質の電極反応が検討さ

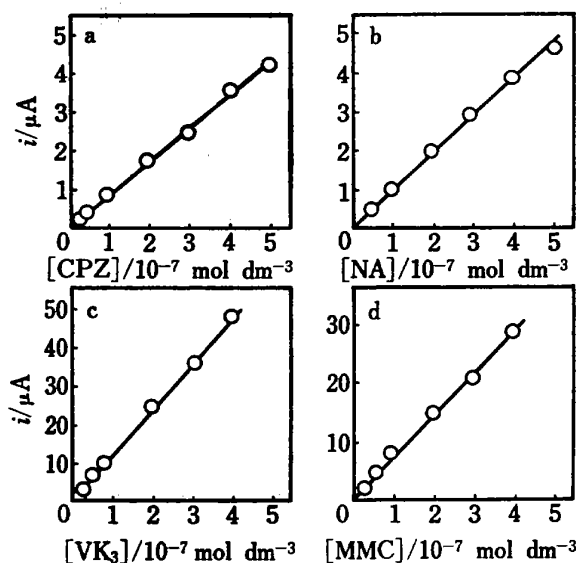


Fig. 6 Relationship between i and the concentration of drugs

Values of i were obtained at (a) 0.53, (b) 0.17, (c) -0.23, (d) -0.25 V in 0.5 mol dm^{-3} phosphate buffer (pH 6.8); R. S. D.: (a) 3.6%, (b) 3.8%, (c) 1.4%, (d) 1.0%

れており, 特に被酸化物質の定量については水銀電極よりも利用性が大である。しかし, 微分パルスボルタンメトリーにおける作用電極としては, 一般にカーボン電極は水銀電極に比べてボルタモグラムの再現性が劣る。

本報では GC 円盤電極を回転して対流による物質輸送を増大させ, 同時に微分パルス法を併用してボルタモグラムの再現性と電流感度の向上を図った。更にその GC 表面には陽極酸化処理を施し, 医薬品定量の高感度化を行った。その結果, 定量限界は CPZ, NA について $5.0 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, VK₃, MMC について $5.0 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ にまで達した。Lundstrom¹²⁾ はカーボン電極を用いた微分パルスポーログラフによる定量限界は, ドーパミン, トリプトファン, アニリンレチニールアセテートについて約 $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ 程度と報告している。

又, Wang ら¹³⁾ は, 飽和塩化ナトリウム溶液中で $\pm 6 \text{ V}$ のく形波電圧を印加して前処理した GC 電極を用いて, $10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ 程度のアセトアミノフェン, ドーパミン, 尿酸の微分パルスボルタモグラムの測定ができることと報じた。これらの結果に比べて本報では更に低濃度まで定量可能であり, 感度の向上が顕著であった。このことは, ドラッグレベルモニタリングで要求される薬物濃度測定法として, 本報が十分適用される可能性を示

している。

文 献

- 1) G. Dryhurst, K. M. Kadish, F. Scheller, R. Renneberg: "Biological Electrochemistry", vol. 1, p. 116 (1982), (Academic Press, New York).
- 2) S. Haward: *Method Enzymol.*, **43**, 373 (1975).
- 3) J. C. Schaar, D. E. Smith: *Anal. Chem.*, **54**, 1589 (1982).
- 4) 高村喜代子, 井上 哲, 楠 文代: 分化, **33**, 198 (1984).
- 5) 高村喜代子, 井上 哲, 伊藤国夫, 楠 文代: 分化, **35**, 161 (1986).
- 6) 今井日出夫, 吉田久信, 升島 努, 尾和 恵: 分化, **30**, 561 (1981).
- 7) E. P. Parry, R. A. Osteryoung: *Anal. Chem.*, **37**, 1634 (1965).
- 8) Y. Yamamoto, K. Hasebe, T. Kambara: *Anal. Chem.*, **55**, 1942 (1983).
- 9) J. Wang, B. A. Freiha: *Anal. Chim. Acta*, **154**, 87 (1983).
- 10) 高村喜代子, 井上 哲, 楠 文代: 日化, **1985**, 1035.
- 11) K. Takamura, S. Inoue, F. Kusu, N. Oyama: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 987 (1985).
- 12) K. Lundstrom: *Anal. Chim. Acta*, **146**, 109 (1983).
- 13) J. Wang, L. D. Hutchins: *Anal. Chim. Acta*, **167**, 325 (1985).

☆

Determination of some drugs by differential pulse voltammetry using a rotating glassy carbon disk electrode. Kiyoko TAKAMURA, Satoshi INOUE, Keiichi IMAEDA, Mitsugu KIKUCHI and Fumiyo KUSU (Tokyo College of Pharmacy, 1432-1 Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-03)

Determination of chlorpromazine, noradrenaline, vitamin K₃ and mitomycin C was made by differential pulse voltammetry using a rotating glassy carbon disk electrode. Pretreatment of glassy carbon was made by anodic oxidation in 0.5 mol dm^{-3} phosphate solution at 1.6 V vs. Ag/AgCl for 2 min. Differential pulse voltammograms of the drugs were obtained at the rotation rate of 2500 rpm, pulse interval, 2 s, pulse modulation, 50 mV, and scan rate, 5 mV s^{-1} . Plots of peak height vs. drug concentration were linear over the concentration range $5 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ for chlorpromazine and noradrenaline, and $5 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ for vitamin K₃ and mitomycin C within the relative standard deviation of 4%.

(Received July 29, 1986)

Keyword phrases

determination of chlorpromazine, noradrenaline, vitamin K₃ and mitomycin C; differential pulse voltammetry; anodically oxidized glassy carbon electrode; rotating disk electrode.