

報 文

多層カーボンナノチューブ分散 Nafion[®] 膜修飾グラッシー カーボン電極と疎水性陽イオン界面活性剤を用いる 17 β -エストラジオールの濃縮ボルタンメトリー

関山 沙織¹, 倉光 英樹^{®1}, 波多 宣子¹, 田口 茂¹

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を分散させた Nafion 溶液をスピコーティング法によりグラッシーカーボン (GC) 表面に薄膜として修飾させた電極を用い、疎水性の高い陽イオン界面活性剤 (ゼフィラミン, 塩化ベンゼトニウム, 臭化セチルトリメチルアンモニウム) 共存下における 17 β -エストラジオール (E2) の電気化学的応答を調査した。Nafion 膜を修飾した GC 電極を用いた場合, E2 の電気化学的酸化応答は支持電解質溶液に陽イオン界面活性剤を添加することにより大きく増加した。更に, MWCNT を分散させた Nafion 膜修飾 GC 電極では, Nafion 膜修飾 GC 電極と比較して, 約 2.5 倍高い E2 の酸化応答が得られた。本研究で用いた陽イオン界面活性剤による E2 の電流応答増大効果は, ゼフィラミンで最も高く得られることが示された。この現象を利用し, 濃縮ボルタンメトリーによる E2 の簡便・高感度定量を試みた結果, 定量範囲は $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$ M, 検出限界は 6×10^{-9} M であった。

1 緒 言

17 β -エストラジオール (E2) は人畜由来のステロイドホルモンのひとつであり, 雌生殖器の発育及び機能維持や, 妊娠の維持などに重要な役割を担っている。また近年では, 下水処理場などから排出される高エストロゲン活性を有する外因性内分泌攪乱化学物質 (EDCs) のひとつとしてもよく知られており, E2 による水生生物への影響が報告されている¹⁾²⁾。E2 はヒトや家畜の尿尿中に含まれているため, 今後も排出され続ける環境汚染物質のひとつでもある。

一般的な E2 の測定法としては, 免疫反応を利用した酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) や液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) が用いられている。ELISA は分析操作が煩雑ではあるが, 市販されているキットでも $10 \sim 500$ pg/mL の E2 の定量が可能であり, 高感度であることが特徴である。しかし, 試料の中に抗体の認識部位を変性させる物質が含まれる場合や, 交差反応などに起因する正の誤差がしばしば問題となる³⁾。また, GC/MS や LC/MS/MS は一般に誘導体化や濃縮などの前処理を必要とするため, 分析操作が煩雑となり, 多量の試料を要する場合もある。したがって, より簡便・迅速な E2 の高感度定量法の開発が必要とされ

ている。

臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) などの疎水性陽イオン界面活性剤を利用した, 吸着ストリッピングボルタンメトリー (adsorptive stripping voltammetry, AdSV) によるフェノール類やチロキシンなどの簡便な高感度分析法が報告されている^{4)~9)}。これらの報告の中で Hu らは, E2 を CTAB 共存下で Nafion 修飾グラッシーカーボン (GC) 電極により測定する AdSV を開発し, 簡便・高感度な E2 の定量を達成している⁷⁾。

一方, カーボンナノチューブ (CNT) は, 炭素原子のみから成る蜂の巣構造のネットが円筒状に丸まったシームレスのチューブである。CNT は, その円筒構造を構成するグラフェンの層数により, 単層 CNT (single-walled carbon nanotube, SWCNT) と多層 CNT (multi-walled carbon nanotube, MWCNT) の二つに大別される。CNT は化学的に安定で高い導電性と広い表面積を持ち, 電子デバイスや複合材料などへの応用が期待され, 現在, 注目されているナノ素材のひとつである。電気化学的分析法への応用も報告されており, 例えば MWCNT を金電極に修飾した電極では, アスコルビン酸の妨害を受けずにドーパミンの選択的な定量に成功している¹⁰⁾。また, ペースト電極として用いた MWCNT が, 抗炎症薬であるピロキシカムの酸化応答を触媒することが明らかになっている¹¹⁾。更に, GC 電極に修飾した CNT による濃縮効果と電極表面積の増大を利用した E2 のボルタンメトリーや EDCs の液体クロマトグラフィー-アンペロメトリック検出法も報告され

¹ 富山大学理工学研究部 (理学): 930-8555 富山県富山市五福 3190

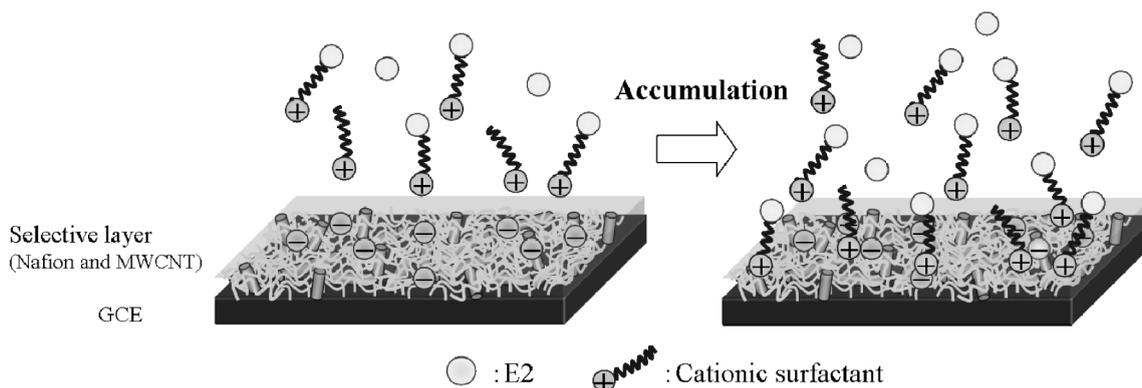


Fig. 1 Schematic diagram for accumulation of E2 on the MWCNT dispersed Nafion film modified GC electrode

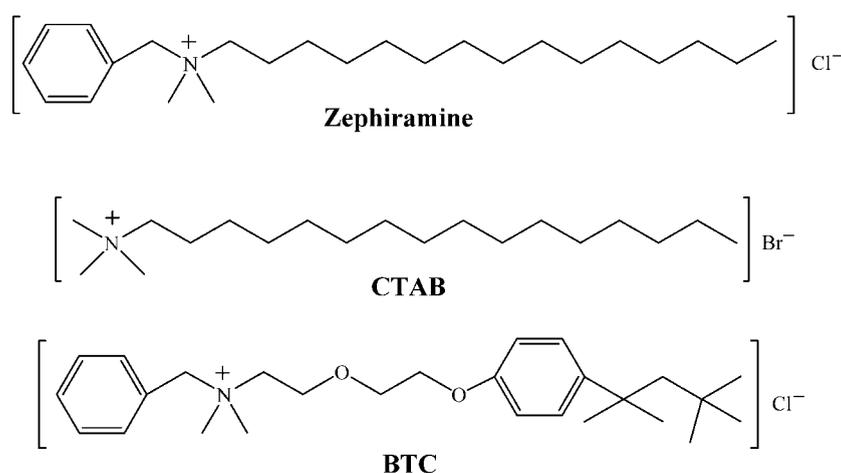


Fig. 2 The molecular structure of Zephiramine, CTAB, and BTC

ている¹²⁾¹³⁾.

本研究では、E2の簡便・高感度な電気化学的定量法の開発を目的とした。MWCNTを分散させたNafion溶液をGC表面にスピコーティングすることで薄膜電極とし、疎水性陽イオン界面活性剤であるゼフィラミン、塩化ベンゼトニウム (BTC)、あるいはCTAB共存下におけるE2の電極挙動を調べた。本法におけるE2の濃縮原理をFig. 1に示す。E2は試料溶液に添加した陽イオン界面活性剤の疎水性部位と吸着し、電極表面に修飾したNafionとの静電的相互作用と、CNTの芳香族炭化水素に対する高い吸着能により濃縮されると考えられる。CNTの有する大きな表面積と導電性を利用し、E2の高感度測定を試みた。

2 実験

2.1 試薬・装置

MWCNT (OD = 20~40 nm, ID = 5~10 nm, length = 0.5~50 μ m, purity \geq 95%), 及びNafion (5 wt%) はAldrichから、E2はSigmaから購入した。塩化ベンジル

ジメチルテトラデシルアンモニウム (ゼフィラミン) は同仁化学研究所のものを使用した。リン酸緩衝溶液として用いたリン酸二水素カリウムとリン酸水素二ナトリウム、及び臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) は和光純薬製を使用した。塩化ベンゼトニウム (BTC) は東京化成工業より購入した。ゼフィラミン、CTAB、BTCの構造式をFig. 2に示す。

電気化学的測定には、モデル1200電気化学アナライザー (ALS) を用いた。作用電極であるGC電極 (OD = 6.0 mm, ID = 3.0 mm)、参照電極である銀/塩化銀 (Ag/AgCl) 電極はBAS製のものを使用した。対極として白金線を用いた。

2.2 MWCNT分散Nafion膜修飾GC電極の作製

MWCNTは濃硝酸で約10時間還流し、よく水洗したものを使用した。エタノールで希釈して1.5 wt%に調製したNafion溶液にMWCNTを2 mg/mL加え、超音波を数時間かけることにより、MWCNT分散Nafion溶液とした。GC電極は粒径0.3及び0.05 mmのアルミナペーストで研

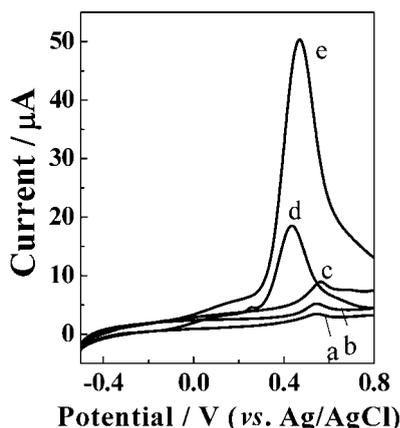


Fig. 3 Linear sweep voltammograms of 1×10^{-5} M E2 in 0.1 M phosphate buffer (pH 8), (a) at bare GC electrode without accumulation, (b) at bare GC electrode with accumulation, (c) at bare GC electrode with accumulation in the presence of Zephiramine, (d) at Nafion modified GC electrode with accumulation in the presence of Zephiramine, (e) at MWNT-Nafion-GC electrode with accumulation in the presence of Zephiramine. The concentration of Zephiramine is 6×10^{-5} M

The potential at -0.5 V was applied for 6 min at the scan rate of 0.2 V/s.

磨し, 蒸留水で洗浄後, 乾燥させた. 洗浄した GC 電極表面に $10 \mu\text{L}$ の MWCNT 分散 Nafion 溶液を置き, 2400 rpm で 1 分間スピコーティングした. 1 昼夜以上, 室温で真空乾燥させ, MWCNT 分散 Nafion 膜修飾 (MWCNT-Nafion-GC) 電極とした.

2・3 実験方法

E2, 及び陽イオン界面活性剤を含むリン酸緩衝溶液 (10 mL) を試料溶液とし, -0.5 V の電位を 6 分間印加後, リニアスイープボルタンメトリーにより $-0.5 \sim 0.8$ V における電流応答を測定した. 走査速度は 0.2 V/s とした.

3 結果・考察

3・1 E2 の電極応答

E2 は不可逆な酸化応答を示すことが知られている¹⁴⁾. 1×10^{-5} M の E2 を含む 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 8) のリニアスイープボルタモグラムを Fig. 3 に示す. 未修飾の GC 電極では 0.56 V 付近に E2 に由来する $1 \mu\text{A}$ 程度の小さな酸化ピークが観測された (curve a). 電極に -0.5 V の電位を 6 分間印加した後に測定したボルタモグラムでは, 酸化ピークがわずかに増大した (curve b). これは, GC 表面への E2 の疎水的な吸着に起因するものと考えられる. しかし, 未修飾の GC 電極では 1×10^{-6} M 以下の濃度の E2 から電流応答は得られなかった. 疎水性陽イオン界面活性剤であるゼフィラミンを試料溶液に 6×10^{-5} M

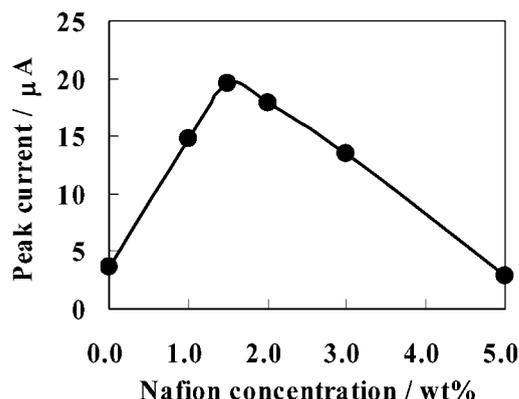


Fig. 4 Effect of the amount of Nafion modified on the GC electrode. The measurements were carried out in 0.1 M phosphate buffer (pH 8) included 1×10^{-5} M E2 and 6×10^{-5} M Zephiramine

Accumulation potential : -0.5 V ; Accumulation time : 6 min ; Scan rate : 0.2 V/s

添加することで酸化電流値は若干増加したが, 陽イオン界面活性剤による E2 の電流値増大効果は, GC 電極ではほとんど得られなかった (curve c). 一方, Nafion 修飾 GC 電極を用いた場合, ゼフィラミンの添加により E2 の酸化電流値は著しく増大し, 酸化電位は GC 電極と比較して負電位にシフトした (curve d). これは, Hu らによる報告⁷⁾と同様に, 電極に Nafion を修飾したことで E2 が陽イオン界面活性剤とともに静電的相互作用により集積されたためであると考えられる. E2 から得られる電流値と印加電位の関係を $+0.6 \sim -0.6$ V の範囲で調べたところ, 電流値は印加電位の減少に従って増大し, 約 -0.45 V 以下ではほぼ一定になった. これは, 電極に負電位を印加することにより, 陽イオン界面活性剤の電極への吸着が促進され, 結果, Nafion 膜中における E2 の表面濃度が増加したためであると考えられる. 一方, MWCNT-Nafion-GC 電極を用いた場合, E2 の酸化ピーク電流は飛躍的に増大し, Nafion 修飾 GC 電極と比較して約 2.5 倍高い応答が得られた (curve e). これは, MWCNT を Nafion 膜に分散させることにより, 電極表面積が大きくなったことや, CNT による芳香族炭化水素の濃縮効果が電極に付与されたためであると考えられる.

3・2 Nafion 濃度と MWCNT 量の検討

GC 電極に修飾する Nafion 膜の厚さを最適化するため, 異なる濃度の Nafion 溶液をスピコーティングして Nafion 修飾 GC 電極を作製し, ゼフィラミンを含むリン酸緩衝溶液中で E2 の電流応答を測定した. その結果, $1 \sim 2$ wt% の Nafion 溶液で作製した電極では, 未修飾の GC 電極と比較して 3 倍以上のピーク電流を与え, 1.5 wt% のときに最も高い電流値が得られた (Fig. 4). Nafion 濃度が 2 wt% 以上になるとピーク電流値は減少し,

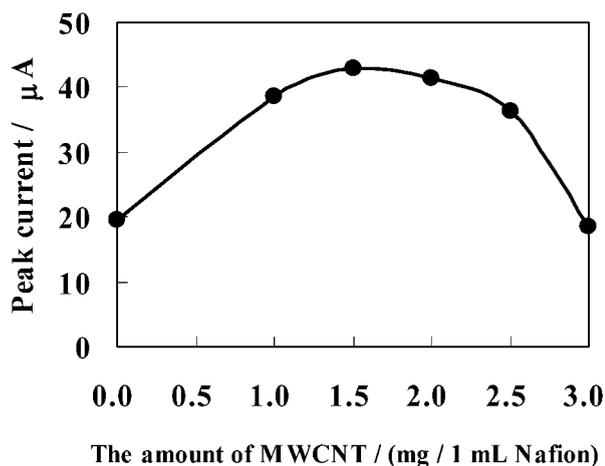


Fig. 5 Effect of the amount of MWNT dispersed into the Nafion film modified on the electrode

The measurements were carried out in 0.1 M phosphate buffer (pH 8) included 1×10^{-5} M E2 and 6×10^{-5} M Zephiramine. Accumulation potential: -0.5 V; Accumulation time: 6 min; Scan rate: 0.2 V/s

5 wt% の Nafion 溶液を用いて修飾した場合には、未修飾の GC 電極から得られる応答よりも小さな電流値が得られた。これは、高濃度の Nafion 溶液をスピコーティングすることで、電極上に導電性の乏しい Nafion 膜が厚く修飾され、電極の活性が低下するためであると考えられる。Nafion 膜が厚い場合、濃縮時間を長くすることで電流応答は増加したが、得られる応答の精度は低下した。

Nafion 膜中に分散させる MWCNT 量を検討した。異なる量の MWCNT を添加・分散させた 1.5 wt% Nafion 溶液を用いて電極を作製し、ゼフィラミン共存下における E2 の電流応答を測定した (Fig. 5)。その結果、1.5 wt% Nafion 1 mL 当たり 1.0~2.5 mg の MWCNT を分散させた場合に E2 の高い電流応答が得られた。これは、MWCNT による表面積、導電性の増加と CNT に特有な芳香族炭化水素に対する吸着効果に起因すると考えられる。しかしながら、Nafion 溶液に分散させる MWCNT 濃度が 3.0 mg/mL 以上の場合では電流応答は減少した。このことは、MWCNT 量の増加に伴い、電極に修飾される Nafion 量が減少するために、陽イオン界面活性剤に吸着した E2 の静電的な濃縮効果が低減するためであると考えられる。

3.3 陽イオン界面活性剤の検討

Hu らの報告では⁷⁾、数種の界面活性剤共存下における E2 の電極応答が検討されており、それらのなかで CTAB が最も効果的であることが示されている。そこで本研究では、CTAB と過去の報告では検討されていないゼフィラミン、BTC を用いて、それぞれの陽イオン界面活性剤共存

下における E2 の電流応答を比較した。 1×10^{-5} M E2 と 6×10^{-5} M 陽イオン界面活性剤を含むリン酸緩衝溶液から得られる酸化電流応答を、既報の Nafion 修飾 GC 電極と、本研究で作製した MWCNT-Nafion-GC 電極を用いて測定した。検討に用いた 3 種の陽イオン界面活性剤いずれの場合も E2 の酸化応答を増大させる効果を示し、得られた E2 の電流応答はすべての界面活性剤共存下で、既報の Nafion 修飾 GC 電極よりも MWCNT-Nafion-GC 電極で高かった。E2 の酸化応答の増大効果は、ゼフィラミン (41.4 μA) > CTAB (24.9 μA) > BTC (21.6 μA) の順で大きく、CTAB と BTC とでは大きな差はなかったが、ゼフィラミンでは CTAB と比較して約 1.7 倍の増大効果が得られた。いずれの界面活性剤も添加しない場合に得られる E2 の電流応答は、2.6 μA に過ぎなかった。Nafion 膜への物質の濃縮は、膜との静電的・疎水的な相互作用に支配される。本研究で用いた陽イオン界面活性剤はいずれも 1 価の陽イオンであるため、E2 の酸化応答の増大効果は添加する陽イオン界面活性剤の疎水性の大きさに依存するものと考えられる。そこで、ゼフィラミン、CTAB 及び BTC の $\log K_{ow}$ を U. S. EPA の KOWWIN¹⁵⁾ を用いて推算したところ、それぞれ 3.91, 3.18, 4.00 となった。CTAB と比較して、分子内にベンゼン環を 1 つ持つゼフィラミンは疎水性が高く、E2 の酸化応答に高い増大効果を示すが、ベンゼン環を 2 つ持つ BTC は、疎水性は高いが、Nafion 膜の 3 次元網目構造に対する立体障害により濃縮効果が疎外されると考えられる。

MWCNT-Nafion-GC 電極による E2 の濃縮の際に添加するゼフィラミンの濃度を検討した。 1×10^{-5} M E2 と異なる濃度のゼフィラミンを含むリン酸緩衝溶液を用いて測定した結果、ゼフィラミン濃度の増加に伴って、E2 の電流応答も増加し、 5×10^{-5} ~ 8×10^{-5} M でほぼ一定のピーク電流値が得られた。したがって、ゼフィラミン濃度は 6×10^{-5} M とした。

また、ゼフィラミン共存下における E2 の濃縮時間を検討した。 6×10^{-5} M のゼフィラミン共存下で 1×10^{-5} M E2 を -0.5 V の電位を印加して 1~10 分間の濃縮を施したところ、E2 の電流応答は 1~6 分間まで濃縮時間に伴い増加し、6 分間以降はほぼ一定値に達した。

3.4 E2 の検量線

MWCNT-Nafion-GC 電極を用いて E2 の検量線を作成した (Fig. 6)。 1×10^{-9} ~ 1×10^{-5} M の E2 と 6×10^{-5} M ゼフィラミンを含むリン酸緩衝溶液 (pH 8) 溶液のリニアスイープボルタモグラムを測定した。その結果、定量範囲は 5×10^{-8} ~ 1×10^{-5} M ($R^2 = 0.997$)、検出限界は 6×10^{-9} M であった。これは既報¹²⁾の MWCNT-Nafion-GC 電極を用いた E2 の定量法と比較して約 5 倍高感度である。

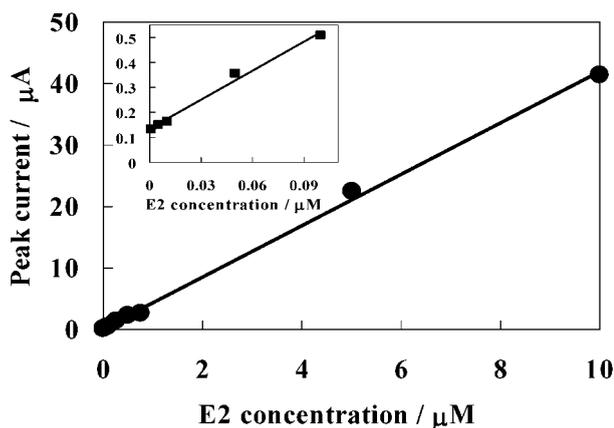


Fig. 6 The calibration curve of E2

The measurements were carried out in 0.1 M phosphate buffer (pH 8) included 6×10^{-5} M Zephiramine. Accumulation potential: -0.5 V; Accumulation time: 6 min; Scan rate: 0.2 V/s

また, 同様に作製した電極を用いた場合に得られる 5×10^{-8} M E2 における相対標準偏差は 12% であった.

4 ま と め

本研究では, MWCNT を分散させた Nafion 溶液を GC 電極表面にスピコーティングすることにより簡便に作製した MWCNT-Nafion-GC 電極を使用し, 3 種の疎水性の高い陽イオン界面活性剤共存下における E2 の酸化電流応答を調査した. ゼフィラミン, CTAB, 及び BTC それぞれの陽イオン界面活性剤の共存で E2 の酸化応答は増大し, その効果はゼフィラミンが最も高かった. MWCNT-Nafion-GC 電極は, 1.5 wt% Nafion 溶液に MWCNT を

2 mg/mL 分散させた溶液を用いて作製することで高い応答性を示した. E2 の定量範囲は $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$ M, 検出限界は 6×10^{-9} M であった.

文 献

- 1) E. J. Routledge, D. Sheahan, C. Desbrow, G. G. Brighty, M. Waldoock, J. P. Sumpter : *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1559 (1998).
- 2) 松井三郎, 足立 淳, 松田知成, 滝上英考, 清水芳久 : “化学総説 No. 50 「内分泌かく乱物質研究の最前線」”, 日本化学会編, p. 86 (2001), (学会出版センター).
- 3) 彼谷邦光 : “環境ホルモンのモニタリング技術—分析・測定法の実際”, 森田昌敏監修, p. 115 (1999), (シーエムシー).
- 4) W. Guo, X. F. Kang, J. F. Song : *Anal. Lett.*, **32**, 2335 (1999).
- 5) B. Zeng, W. C. Purdy : *Electroanalysis*, **11**, 879 (1999).
- 6) H. Yi, K. Wu, S. Hu, D. Cui : *Talanta*, **55**, 1205 (2001).
- 7) S. Hu, K. Wu, H. Yi, D. Cui : *Anal. Chim. Acta*, **464**, 209 (2002).
- 8) F. Wang, J. Fei, S. Hu : *Colloids Surfaces B : Biointerfaces*, **39**, 95 (2004).
- 9) W. Huang : *Bull. Korean Chem. Soc.*, **26**, 1560 (2005).
- 10) P. Zhang, F.-H. Wu, G.-C. Zhao, X.-W. Wei : *Bioelectrochem.*, **67**, 109 (2005).
- 11) A. Abbaspour, R. Mirzajani : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**, 41 (2007).
- 12) N. Terui, B. Fugetsu, S. Tanaka : *Anal. Sci.*, **22**, 895 (2006).
- 13) D. Vega, L. Agui, Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeno, J. M. Pingarron : *Talanta*, **71**, 1031 (2007).
- 14) H. Kuramitz, Y. Nakata, M. Kawasaki, S. Tanaka : *Chemosphere*, **45**, 37 (2001).
- 15) U. S. EPA, Estimation Program Interface (EPI) Suite, KOWWIN <<http://www.epa.gov/opptintr/exposure/docs/episuite.htm>>.

Accumulation Voltammetry for 17β -Estradiol Using Hydrophobic Cationic Surfactant and Glassy Carbon Electrode Modified with Multi-Walled Carbon Nanotube Dispersed Nafion Membrane

Saori SEKIYAMA¹, Hideki KURAMITZ¹, Noriko HATA¹ and Shigeru TAGUCHI¹

¹ Department of Environmental Biology and Chemistry, Graduate School of Science and Engineering for Research, University of Toyama, 3190, Gofuku, Toyama-shi, Toyama 930-8555

(Received 10 January 2008, Accepted 21 May 2008)

A simple and sensitive voltammetric method for detecting 17β -estradiol (E2) was developed. The Nafion membrane dispersed multi-walled carbon nanotube (MWCNT) modified electrode was prepared by spin-coating a 1.5 wt% Nafion ethanolic solution including 2 mg/mL MWCNT on glassy carbon (GC) at 2400 rpm. The voltammetric behavior of E2 was investigated with linear sweep voltammetry in an electrolyte including a hydrophobic cationic surfactant, such as Zephiramine, benzethonium chloride (BTC), and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The peak current for the oxidation of E2 at the MWCNT-Nafion-GC electrode was enhanced by the presence of each hydrophobic cationic surfactant. The enhancement effect by Zephiramine was strongest when compared to the others. Although E2 below a concentration of 1×10^{-6} M at a bare GC electrode can not be measured, the peak current for the oxidation of 1×10^{-9} M E2 could be observed by using the MWCNT-Nafion-GC electrode in the presence of 6×10^{-5} M Zephiramine.

Keywords : 17β -estradiol ; voltammetry ; Nafion membrane ; carbon nanotube ; highly hydrophobic cationic surfactant.