

グラッシーカーボンを下地電極とするグルコース電極

松本, 清
九州大学農学部食品分析学講座

吉岡, 章二
九州大学農学部食品分析学講座

野村, 孝一
九州大学農学部食品分析学講座

箴島, 豊
九州大学農学部食品分析学講座

<https://doi.org/10.15017/23299>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 34 (3/4), pp.115-121, 1980-07. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

グラッシーカーボンを下地電極とするグルコース電極

松本 清・吉岡 章 二
野村 孝一・箆島 豊

九州大学農学部食品分析学講座

(1980年4月10日受理)

Glucose Electrode Using Glassy Carbon as Base Electrode

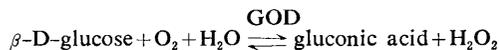
KIYOSHI MATSUMOTO, SHOJI YOSHIOKA, TAKAKAZU NOMURA
and YUTAKA OSAJIMA

Laboratory of Food Analysis, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-09, Fukuoka 812

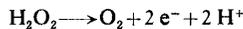
緒 言

酵素電極は電気化学的センサーと固定化酵素薄膜とを組み合わせた電極であり、きわめて迅速な応答と高い選択性を有するものとして急速に発展しつつある(河島, 1977; Guilbault, 1977; Gray *et al.*, 1977).

グルコースはグルコースオキシダーゼ (GOD) の存在のもとに次の反応によって酸化される。



従って、生成された過酸化水素を電気化学的に酸化分解することによりグルコースセンサーを設計することが可能である (Guilbault and Lubrano, 1972, 1973).



酵素電極の開発においては、酵素の固定化法 (Guilbault and Lubrano, 1973) のみならず、下地電極として用いる電極ならびに膜素材の選択 (Broun *et al.*, 1973) が酵素電極の良否を左右する。グルコース電極においては従来 GOD の作用によって生成される過酸化水素を白金電極で検知する方法 (Guilbault and Lubrano, 1972, 1973; Lubrano and Guilbault, 1978; Thévenot *et al.*, 1979) あるいは酵素反応で消費される酸素を検知する方法 (Updike and Hicks, 1967; 相沢・鈴木, 1976; Nanjo and Guilbault, 1974) が行われてきた。一方、膜素材としては

ポリアクリルアミドゲル (Updike and Hicks, 1967; Mell and Maloy, 1975) あるいはセルロース膜 (Watson *et al.*, 1979) などの各種膜を用いる方法が行われてきたが、近年、生物由来の素材を用いる研究が透過性、再現性の点から注目を集めてきた (Lubrano and Guilbault, 1978; Nanjo and Guilbault, 1974; Aizawa *et al.*, 1974; Coulet *et al.*, 1974; 杉浦・豊田, 1977)。

著者らはグラッシーカーボン電極がきわめて電極特性に優れていることに着目し (三輪・水池, 1975; Blaedel and Jenkins, 1974, 1976), この電極を過酸化水素の酸化分解に適用して高感度かつ安定な結果を得た。本研究においては、グラッシーカーボン電極を下地電極とし、牛のアキレス腱から得られたコラーゲンを膜素材とするグルコース電極を試作し良好な結果を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 装置

ポーラログラフ: 柳本製作所製ポーラログラフ P-8 型。

電流測定装置: メトローム社製自動記録式電位差測定装置 E-436 型。

恒温装置: 東洋科学産業製クールメイト TE-104 S 型。

2. 試薬および調製法

リン酸塩緩衝液: 1/15 M KH_2PO_4 と 1/15 M Na_2HPO_4 とを用いて所定の pH に調整した.

水酸化ナトリウム-クエン酸カリウム緩衝液: 0.1 M NaOH と 0.1 M $\text{KH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ にて調整した.

グルコース溶液: 石津製薬製 D (+)-グルコース (無水物) を所定の pH のリン酸塩緩衝液に溶解し一昼夜放置して平衡に達せしめた.

コラーゲン: Sigma 社製コラーゲン (Insoluble Type I, from Bovine Achilles Tendon, No C-9879) を使用した.

グルコースオキシダーゼ (GOD): Sigma 社製グルコースオキシダーゼ (β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase; E. C. 1. 1. 3. 4; Type II, from *Aspergillus niger*) を使用した.

グルタルアルデヒド: 半井化学薬品製 25% グルタルアルデヒド (電子顕微鏡用特級試薬) を用いた.

ペルオキシダーゼ (POD): Sigma 社製ペルオキシダーゼ (Donor: hydrogenperoxide oxidoreductase; E. C. 1. 11. 1. 7, from horseradish, No P-8000) を使用した.

o-ジアニジジン: Sigma 社製 o-ジアニジジン二塩酸塩を用いた.

その他の試薬はすべて特級試薬をそのまま用いた.

色素溶液: (A) o-ジアニジジン 10 mg, POD 1 mg を 2 ml の水と 2 ml の 99% エタノールとで溶解し, 1/15 M リン酸塩緩衝液 (所定の pH) で 100 ml に定容した. (B) o-ジアニジジン 100 mg, POD 10 mg を 99% エタノール 2 ml に溶解し, 水にて 100 ml に定容した.

3. グラッシーカーボン電極 (GCE)

東海電極製グラッシーカーボン棒 GC-20 (2 cm 1 cm ϕ) をエポキシ樹脂で 1 cm (内径) のテフロン管中に封入し, カーボン上に入れてある水銀中に銅線を浸漬して電氣的に連結した. 電極表面はエメリーペーパー # 1500 で十分研磨した後, 酸化セリウムを散布した鹿皮上で仕上げの研磨を行った. 研磨終了後, 7 M アンモニア水溶液, 続いて 5% 水酸化ナトリウムのエタノール溶液中でそれぞれ 3 分間超音波洗浄し, 十分水洗した. 電極前処理として +1.2 V ~ -1.2 V の間で 0.2 V/min の速度で 20 分間直流電圧を反復掃引印加した. 電極研磨, 超音波洗浄および電極前処理は必要に応じてその都度を行った. 電気化学的挙動の

測定および酵素電極特性の測定ともに 2 極式で行い, 飽和カロメル電極 (SCE) または白金を対極とした.

4. 遊離および固定化酵素の活性測定

GOD 反応 (Fig. 1, 反応式 (1)) によるグルコースの酸化によつて生成する過酸化水素を POD 反応 (Fig. 1, 反応式 (2)) と共役させ, 還元型色素 (o-ジアニジジン) から酸化型色素への変化を分光学的に測定した. 酵素反応を 10 分間行わせ, 4 N 塩酸にて反応を停止させた後, 400 nm の吸光度を測定した. 反応温度およびリン酸塩緩衝液は特記しないかぎりそれぞれ (25 \pm 0.1) $^{\circ}\text{C}$, pH 6.6 とし, 色素液は使用に依り前記 (A) 液または (B) 液を用いた.

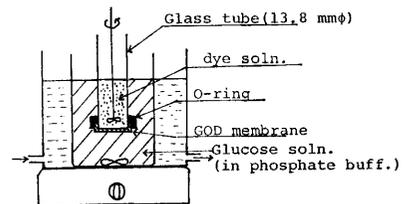
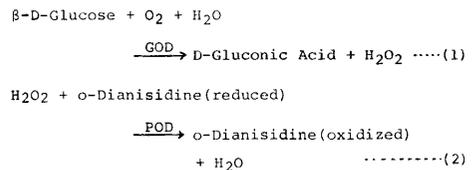


Fig. 1. Apparatus for measuring the characteristics of membranes.

5. 固定化酵素膜調製法

コラーゲン溶液調製法: 杉浦・豊田の方法 (1977) を一部変更して行った. すなわち, コラーゲン 1 g を 0.4 M 酢酸 100 ml に溶解し外部から氷冷しながら 20 分間ホモジナイズし, 1 時間放置した後さらに 20 分間ホモジナイズした. 一昼夜 5 $^{\circ}\text{C}$ に放置し再度上記操作を繰り返した. この溶液をセルロースチューブに入れ 4 $^{\circ}\text{C}$ の水で透析を行い, コラーゲン溶液の pH が 4 付近になるまで透析した. 透析後, 9000 rpm で 20 分間遠心分離 (0 $^{\circ}\text{C}$) した. 上澄, 下層を廃棄し, 均質な中間層 (コラーゲン 0.7~0.8%) を得た. 膜調製時に水にて適宜希釈 (コラーゲン約 0.35%) し, 脱気して使用した.

固定化膜調製法: 既知濃度の一定量コラーゲン溶液に所定量の GOD を均一に分散させ, 定表面積の均一なガラス容器に流し, 5 $^{\circ}\text{C}$, 20% 相対湿度にて風乾させ, ほぼ乾燥した段階で架橋剤のグルタルアルデ

ヒドにて処理した。風乾後、リン酸塩緩衝液を加えて膜を取りはずし、2~3回緩衝液で洗浄した。膜洗浄後、1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.6) に浸漬し実験に供した。膜保存にはこれを風乾しデシケーター中で5°C 保存を行った。膜の活性は1年半以上低下しなかった。なお、膜厚は種々検討し膜強度、膜透過性の観点から10 μm 程度(乾燥状態)になるようにした。

6. 測定操作

過酸化水素の GCE 上での挙動: 過酸化水素の電流-電圧曲線は通常のポラログラフ装置によって求めた。支持電解質として所定 pH の 1/15 M リン酸塩緩衝液を用い、GCE を作用電極とし輝白金板を対極とした2極方式とした。-0.2 V (vs. Pt) の直流電圧を印加し電流値が低レベルになるのを待って、0 V (vs. Pt) から 0.2 V/min の速度で陽極方向に電圧掃引した。

GOD 固定化膜の透過性および性質: Fig. 1 に示すように円筒ガラス管 (13.8 mmφ) に固定化酵素膜を O リングで装着し、内部に色素溶液外部に所定濃度のグルコース溶液を入れ、内外ともに攪拌子または回転子で攪拌しながら一定時間反応させた。反応後、管内の色素溶液を 4N 塩酸で反応停止させ吸光度 (400 nm) を測定した。なお、固定化酵素膜の性質は所定濃度、pH のグルコース溶液に一定面積 (直径 7 mm の円形) の膜片を入れ、平底試験管中で攪拌しながら一定時間反応させ上記と同様の操作で吸光度を測定した。

酵素電極の特性: 固定化酵素膜を GCE に装着し O リングで固定した。この酵素電極を一定量のリン酸塩緩衝液の入ったセル中に浸漬し白金板を対極として +0.9 V (vs. Pt) の電圧を印加した。電流が一定値を示した後 (約 2 分後)、グルコース溶液を添加し酵素反応によって生成した過酸化水素の酸化電流を測定してブランクとの電流差を測定電流とした。

結果および考察

1 過酸化水素の陽極酸化

GCE における過酸化水素の陽極酸化を Fig. 2 に示す。Fig. 2 から明らかなように過酸化水素は良好な電流-電圧曲線を与えた。低濃度の過酸化水素の場合、限界電流は幾分不明瞭であるが 2 mM 付近の濃度では明瞭なプラトー領域を与えた。

電流-電圧曲線の pH 依存性を Fig. 3 に示す。pH 5.6 付近の場合、プラトー領域が不明瞭でなら

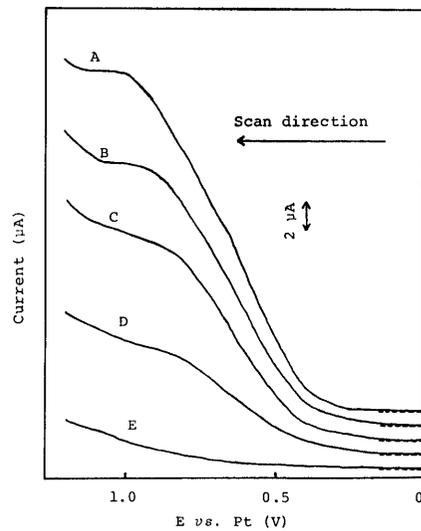


Fig. 2. Current-potential curves for concentration dependence of H₂O₂ at glassy carbon electrode. H₂O₂ concn.: A=2.65 mM; B=1.86 mM; C=1.33 mM; D=0.53 mM; E=Residual current, Scan rate: 0.2 V/min, 1/15 M Phosphate buffer (pH 5.6).

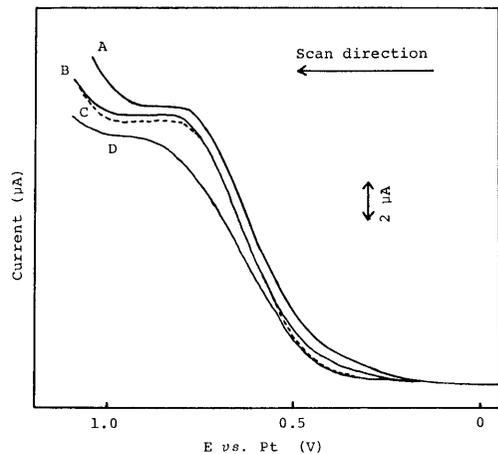


Fig. 3. Current-potential curves for pH dependence of H₂O₂ at glassy carbon electrode. H₂O₂ concn.=1.28 mM, 1/15 M Phosphate buffer: A=pH 8.05; B=pH 7.00; C=pH 6.60; D=pH 5.60, Scan rate: 0.2 V/min.

かな曲線を示したが、pH 6.6 および 7.0 では +0.8 V ~ +1.0 V (vs. Pt) にわたって明瞭なプラトー領域を与えた。また、pH 8.0 以上では逆にプラトー領域が狭くなる曲線を与えた。従って過酸化水素の陽極酸化においては pH 6.6~7.0 が好ましい。

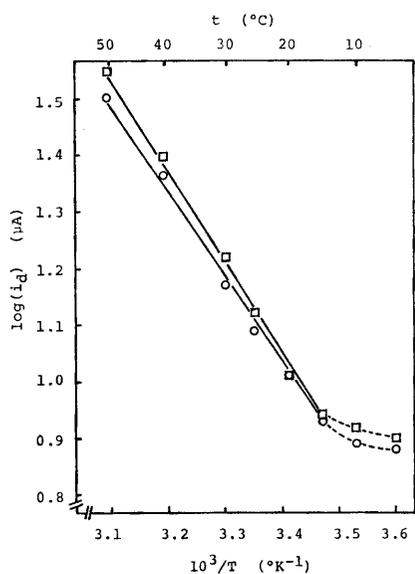


Fig. 4. Effect of temperature on oxidation current of H_2O_2 . H_2O_2 concn.: 0.7 mM, Potential: $\circ = +0.9$ V; $\square = +1.0$ V, 1/15 M Phosphate buffer (pH 6.6).

GCE における過酸化水素の温度特性を Fig. 4 に示す。0~50°C の範囲で温度上昇に伴い電流値が増大し、15~50°C の範囲で $\log i_d$ vs. $1/T$ プロットは直線を示した。

Braedel and Jenkins (1974) は GCE による NADH の酸化反応において電圧掃引法による場合はブランク値がかなり高くなり、電極活性物質との電流値の差を小さくすると報告している。本実験においても +0.8~+1.0 V (vs. Pt) 付近においてブランク値はかなり高い値を示しているが、酵素電極法においては実際上定常状態で測定されることになるため、ブランク値の大小が測定値に影響する割合は小さいと考えられる。

2 GOD 固定化コラーゲン膜の透過能および性質

Fig. 5 に膜透過能の基質濃度依存性、酵素含量依存性およびグルタルアルデヒド濃度依存性を示す。図中 A はグルコース濃度を変えた場合に透過生成される過酸化水素の発色度合を示したものである。A から明らかのように膜透過はグルコース濃度に対して完全な比例性を示した。B は GOD 濃度の膜透過能に及ぼす影響を示したものである。GOD 含量の増加に伴い吸光度の増大がみられるが、GOD が 20 units/cm² 程度になるとほぼ一定値を示した。C はグルタルアルデヒド濃度の膜透過能に及ぼす効果を示したも

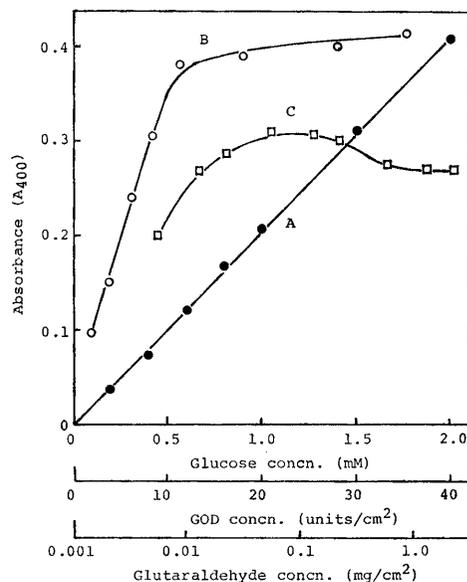


Fig. 5. Permeation characteristics of GOD immobilized membranes. A: Effect of glucose concn. (GOD=70 units/cm²; Glutaraldehyde=0.2 mg/cm²), B: Effect of GOD concn. (Glucose=1 mM; Glutaraldehyde=0.2 mg/cm²), C: Effect of glutaraldehyde concn. (Glucose=1 mM; GOD=15 units/cm²), 1/15 M Phosphate buffer (pH 6.6).

のである。0.05 mg/cm² 付近の濃度で処理した膜が最も高い透過能を与えた。低濃度のグルタルアルデヒドでは酵素が十分架橋されず、膜の活性低下をまねくと同時に膜強度が低く酵素膜としては不適當である。一方、1 mg/cm² 以上の高濃度では膜強度は大であるが架橋能が強すぎ、酵素の活性部位に何らかの変化を与え膜の活性が低下するように思われた (White and Guilbault, 1978)。従つて、グルタルアルデヒド濃度は 0.05~0.5 mg/cm² が適當と考えられた。

Table 1 に遊離酵素および固定化酵素の至適 pH、至適温度ならびに K_m ($K_{m(app)}$) 値を示す。遊離酵素の場合には至適温度 30~35°C であるのに対し、固定化酵素では 35~40°C 付近にみられ固定化により至適温度が幾分高温部に移動した。至適 pH は遊離酵素の場合 pH 5.6 付近であるのに対し、固定化酵素は pH 6.6 を示し約 1 pH 単位アルカリ側に移行した。Guilbault and Lubrano (1973) はこの理由を膜素材の荷電性との相関で説明しようとしている。一方、Thévenot *et al.* (1979) は再生コラーゲン膜にジアゾ化、カップリング法を用いて GOD を固定化しているが、この膜においては固定化による至適 pH 変

Table 1. Comparisons of free enzyme with immobilized enzyme.

	Free	Immobilized
Optimum temp.	30–35°C	35–40°C
Optimum pH	5.6	6.6
K_m	$K_m = 15.6 \text{ mM}$	$K_{m(\text{app})} = 16.7 \text{ mM}$

化はみられていない。本実験の場合、コラーゲン蛋白中のアミノ酸残基と GOD との架橋において何らかの変化が起こり pH 変化を起こしたものと推定される。酵素反応の K_m 値は遊離の場合 15.6 mM であるのに対し、固定化酵素の見かけの K_m 値 ($K_{m(\text{app})}$) は 16.7 mM を示し固定化により基質との親和性がわずかに低下した。

3 GOD 固定化酵素電極の特性

電極間加電圧の最適値を知るため、グルコース濃度に対する電流値を加電圧をパラメーターとして検討し Fig. 6 を得た。GCE による過酸化水素の陽極酸化において +0.9 ~ +1.0 V (vs. Pt) 付近にプラトーが得られたことと一致し (Fig. 2), +0.9 V および +1.0 V で良好な感度と直線性が得られた。+0.9 V の場合、感度の点では +1.0 V より優れているが、直線領域の広さの点では +1.0 V の方が良好な結果を与えた。

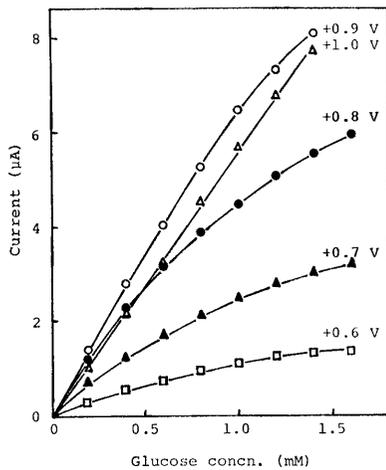


Fig. 6. Effect of potential on glucose electrode response. Temp.: 25°C, 1/15 M Phosphate buffer (pH 6.6).

酵素電極の時間応答曲線を Fig. 7 に示す。図から明らかなようにグルコース濃度 0.2 mM で約 30 秒, 0.5 mM でも約 1 分で完全な定常状態が得られた。このことは本電極の応答がきわめて速く迅速分析に適し

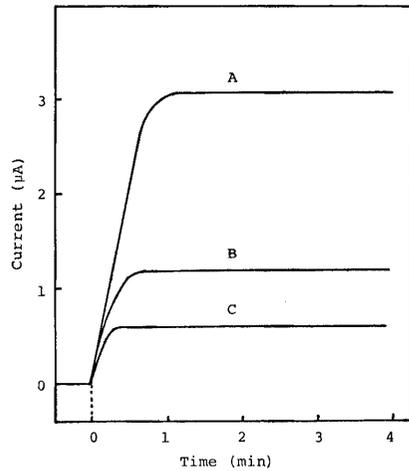


Fig. 7. Response curves for glucose electrode. Glucose concn.: A=0.5 mM; B=0.2 mM; C=0.1 mM, Potential: +0.9 V (vs. Pt), Temp.: 25°C, 1/15 M Phosphate buffer (pH 6.6).

ていることを示すものである。

GCE の応答および固定化酵素の活性は温度によつてかなり影響されるため、酵素電極の温度依存性はその両方の影響を複合したものと現われてくることになる。Fig. 8 は酵素電極の温度依存性を示したものである。温度上昇に伴い電流値は増大し、20 ~ 40°C の範囲で log i vs. 1/T プロットが直線を示した。

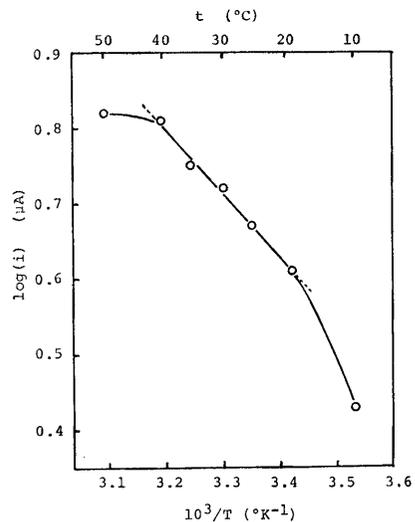


Fig. 8. Effect of temperature on glucose electrode response. Glucose concn.: 0.5 mM, Potential: +0.9 V (vs. Pt), Temp.: 25°C, 1/15 M Phosphate buffer (pH 6.6).

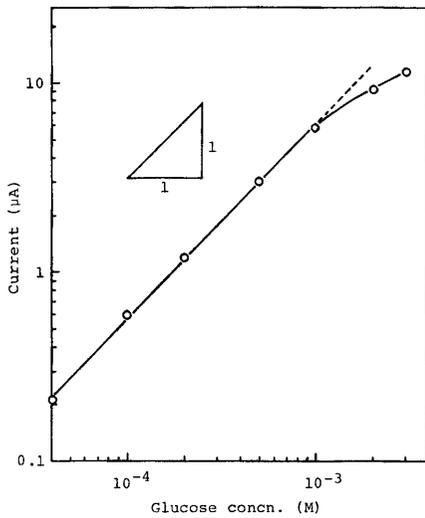


Fig. 9. Calibration curve for glucose electrode. Potential: +0.9 V (vs. Pt), Temp.: 25°C, 1/15 M Phosphate buffer (pH 6.6).

このことは GOD 固定化酵素が 20~40°C にわたって安定であることを示すものである。測定温度を高めることにより測定感度を高めることは可能であるが、電極の長期安定性、測定液の蒸発による誤差さらには温度コントロールの精度の低下などの点から温度を上げすぎるとは好ましくなく、測定温度としては 25°C あるいは 30°C が推奨される。

本酵素電極による検量線の一例を Fig. 9 に示す。グルコース濃度 40 μM~1 mM にわたって良好な直線が得られ、対数プロットによる直線の傾きは 1 で、電流値はグルコース濃度に比例した。なお、試作酵素電極は膜調製後 6 ヶ月にわたって安定であった。

4 回収率

市販柑橘果汁に既知量のグルコースを添加し回収率を求め Table 2 を得た。試料としては市販 50% 果汁の 2 倍希釈液に既知量のグルコースを添加したもの

Table 2. Recovery test for glucose electrode.

No.	Added (mM)	Found (mM)	Recovery (%)
1	0	0.080	—
2	0.1	0.180	100.0
3	0.2	0.285	102.5
4	0.4	0.490	102.5
5	0.6	0.710	105.0
6	0.8	0.880	100.0
Average			102.0

を用いた。それぞれの試料溶液 0.1 ml を予め酵素電極を浸漬した 50 ml のリン酸塩緩衝液 (pH 6.6) に添加し、添加時の電流値の変化を測定した。Table 2 から明らかのように回収率は良好で平均値 102% を与えた。

要 約

再生コラーゲン膜を用いたアンペロメトリック型グルコース電極を開発した。グルコースオキシダーゼを二官能試薬であるグルタルアルデヒドにより再生コラーゲン膜に架橋した。下地電極にはグラッシーカーボン電極を用いた。20 units/cm² のグルコースオキシダーゼおよび 0.05 mg/cm² のグルタルアルデヒドを含む膜が最も良好な膜特性を与えた。固定化酵素の至適 pH および至適温度はそれぞれ pH 6.6 および 35~40°C であった。本酵素電極は +0.9~+1.0 V (vs. Pt) において最高の応答および最良の直線性を示した。定常法を用いた場合、酵素電極の応答時間は 1 分以下であった。応答は 40 μM~1 mM の領域のグルコースに対して直線を与えた。添加実験による回収率は平均 102% であった。試作酵素電極は半年以上にわたって安定であった。本酵素電極は食品試料のグルコース分析に有効と考える。

文 献

- Aizawa, M., I. Karube and S. Suzuki 1974 A specific bio-electrochemical sensor for hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta*, 69: 431-437
- 相沢益男・鈴木周一 1976 選択的反応性膜：酵素膜の電気化学的調製法と電気化学的センサーへの応用。電化, 44: 279-284
- Blaedel, W. J. and R. A. Jenkins 1974 Steady-state voltammetry at glassy carbon electrodes. *Anal. Chem.*, 46: 1952-1955
- Blaedel, W. J. and R. A. Jenkins 1976 Study of a reagentless lactate electrode. *Anal. Chem.*, 48: 1240-1247
- Broun, G., D. Thomas, G. Gellf, D. Domurado, A. M. Berjonneau and C. Guillon 1973 New methods for binding enzyme molecules into a water-insoluble matrix: Properties after insolubilization. *Biotechnol. Bioeng.*, 15: 359-375
- Coulet, P. R., J. H. Julliard and D. C. Gautheron 1974 A mild method of general use for covalent coupling of enzymes to chemically activated collagen films. *Biotechnol. Bioeng.*, 16: 1055-1068
- Gray, D. N., M. H. Keyes and B. Watson 1977

- Immobilized enzymes in analytical chemistry. *Anal. Chem.*, **49**: 1067A-1078A
- Guilbault, G. G. 1977 Enzyme electrodes in analytical chemistry. In "Comprehensive Analytical Chemistry," Vol. 8, ed. by G. Svehla, Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam, pp. 1-70
- Guilbault, G. G. and G. J. Lubrano 1972 Enzyme electrode for glucose. *Anal. Chim. Acta*, **60**: 254-256
- Guilbault, G. G. and G. J. Lubrano 1973 An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal. Chim. Acta*, **64**: 439-455
- 河島拓治 1977 酵素電極. *ぶんせき*, (1977): 681-692
- Lubrano, G. J. and G. G. Guilbault 1978 Glucose and L-amino acid electrodes based on enzyme membranes. *Anal. Chim. Acta*, **97**: 229-236
- Mell, L. D. and J. T. Maloy 1975 A model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the immobilized glucose oxidase system. *Anal. Chem.*, **47**: 299-307
- 三輪智夫・水池 敦 1975 ストリッピング・ポルタンメトリー. *ぶんせき*, (1975): 356-364
- Nanjo, M. and G. G. Guilbault 1974 Enzyme electrode for L-amino acids and glucose. *Anal. Chim. Acta*, **73**: 367-373
- 杉浦正昭・豊田春和 1977 β -グルコシダーゼ-コラーゲン膜の反応性と透過性. *農化*, **51**: 703-708
- Thévenot, D. R., R. Sternberg, P. R. Coulet, J. Laurent and D. C. Gautheron 1979 Enzyme collagen membrane for electrochemical determination of glucose. *Anal. Chem.*, **51**: 96-100
- Urdike, S. J. and G. P. Hicks 1967 The enzyme electrode. *Nature*, **214**: 986-988
- Watson, B., D. N. Stifel and F. E. Semersky 1979 Development of a glucose analyzer based on immobilized glucose oxidase. *Anal. Chim. Acta*, **106**: 233-242
- White, W. G. and G. G. Guilbault 1978 Lysine specific enzyme electrode for determination of lysine in grains and foodstuffs. *Anal. Chem.*, **50**: 1481-1486

Summary

Amperometric enzyme electrode for glucose based on collagen membrane was developed. The glucose oxidase was co-crosslinked with reconstructed collagen using the bifunctional agent, glutaraldehyde. The base electrode used was glassy carbon electrode. Membranes containing 20 units/cm² glucose oxidase and 0.05 mg/cm² glutaraldehyde gave the most preferable membrane characteristics. The optimum pH and the optimum temperature of the immobilized enzyme membrane was pH 6.6 and 35~40°C, respectively. The enzyme electrode gave the highest response and the best linearity at the potential of +0.9~+1.0 V (vs. Pt). The response time of the enzyme electrode was less than 1 min if a steady-state method was used. The response was proportional to glucose concentration in the 40 μ M~1 mM range. The recovery test gave 102% in average. The enzyme electrode was stable for over a half-year. This electrode is very favorable for glucose assays in food samples.