

# 福岡工業大学 機関リポジトリ

## FITREPO

Title	酸化還元色素電解重合膜の電気化学特性とチロシナーゼを用いた2,4-ジクロロフェノールセンサへの応用
Author(s)	川上満泰
Citation	福岡工業大学研究論集 第39巻第2号 P177-P184
Issue Date	2007
URI	<a href="http://hdl.handle.net/11478/445">http://hdl.handle.net/11478/445</a>
Right	
Type	Research Paper
Textversion	publisher

Fukuoka Institute of Technology

# 酸化還元色素電解重合膜の電気化学特性とチロシナーゼを用いた 2,4-ジクロロフェノールセンサへの応用

川 上 満 泰 (生命環境科学科)  
大 原 友 太 (機能材料工学専攻)  
神 谷 英 和 (生命環境科学科)  
天 田 啓 (生命環境科学科)

## Electrochemical Properties of Electropolymerized Redox Dyes and Their Application to Tyrosinase-based 2, 4-Dichlorophenol Biosensor

Mitsuyasu KAWAKAMI (Department of Life, Environment and Materials Science)

Yuta OHARA (Functional Materials Engineering, Graduate School of Engineering)

Hidekazu KOYA (Department of Life, Environment and Materials Science)

Kei AMADA (Department of Life, Environment and Materials Science)

### ABSTRACT

Three redox dyes, Neutral Red (NR), Brilliant Cresyl Blue (BCB), and Toluidine Blue (TB), which have similar substituents on phenazine, phenoxazine, and phenothiazine ring structures independently, have been electropolymerized with cyclic voltmmometric technique onto graphite electrodes. These polyazines were found to show inherent redox activities, while the redox potentials were shifted to the positive potential region compared with those of the corresponding monomer. Enzyme electrodes constructed with tyrosinase (EC 1.14.18.1) showed the sensor response against 2, 4-dichlorophenol (2, 4-DCP) employed as a model substrate, and it was observed that the response current could be increased by introducing a layer of poly (NR) or poly (BCB) on the surface of graphite electrodes. It is suggested that these redox active polyazine layers act as electron mediators, though unambiguous evidence has not been obtained by examining the change of cyclic voltammograms with addition of the substrate.

Key Words: *redox dyes, electropolymerization, tyrosinase, 2, 4-dichlorophenol, biosensor*

### 1. 緒 言

電解重合は、電極表面に電気化学的に活性なポリ

マーを形成させることにより、化学修飾電極を作製する有力な手法として知られている。適切な物理化学的性質をもつモノマーを適切な条件で重合すれば導電性を有する膜を比較的容易に調製でき、これまでに直接電子移動型の電極触媒反応 (Fig. 1) を利用したバイオセンサの開発への応用が試みられてきた<sup>1-8)</sup>。

平成18年10月23日受付

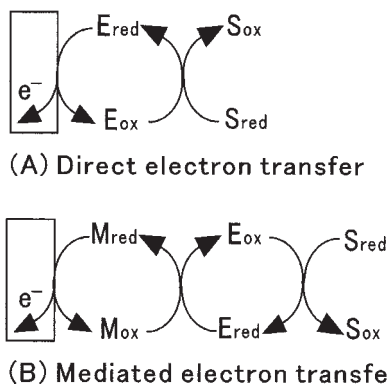
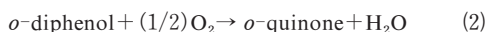
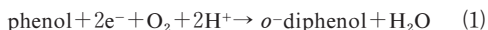


Fig. 1 Mechanisms of electrocatalysis; E: enzyme, S: substrate, M: mediator.

酸化還元色素は、酸化還元滴定の指示薬などとして広く用いられており、特有の酸化還元電位において速やかに酸化または還元されて変色する性質もっている。そこでこのような電気化学的酸化還元活性に注目し、バイオセンサの電子メディエータとして、phenothiazine<sup>9)</sup>, Methylene Blue<sup>10)</sup>, Azur B<sup>11)</sup>, Toluidine Blue<sup>12)</sup>などが検討されてきた。これらの報告において色素化合物は、単体(モノマー)のまま吸着や化学結合などによって電極表面に導入されている。

一方、Karyakinらは、種々のazine化合物の電解重合を試み、azineの化学構造と重合条件との関係や、生成するポリazine膜の電気化学的性質について報告している<sup>13,14)</sup>。電解重合によって電極表面に酸化還元活性を有するポリマーを形成させる手法は、バイオセンサの新しい調製法として注目される。

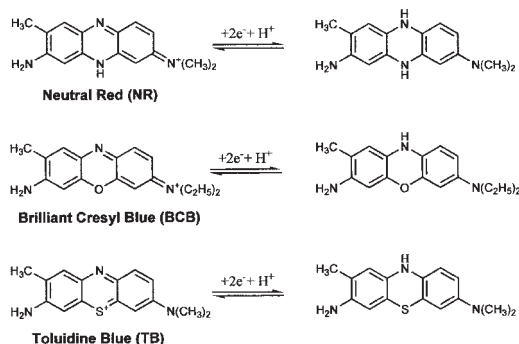
チロシナーゼ(EC 1.14.18.1)は、銅の2核錯体を活性中心にもち、O<sub>2</sub>の存在下で次式のようにモノフェノラーゼ活性(1)とジフェノラーゼ活性(2)を示す。この反



応特異性を利用し、電気化学的に活性なジフェノールやキノンの電極上での反応電流を測定することにより、フェノールあるいはジフェノール(カテコール)センサが構成される。これまでチロシナーゼを用いたフェノール類センサに関する研究は活発に行われてきたが<sup>7,8,15-26)</sup>、メディエータを用いたフェノールセンサの報告は少ない<sup>27-29)</sup>。さらに、酸化還元活性を有するポリマーを電子メディエータとして用いたバイオセンサの報告はほとんどなく、polyvinylferrocene<sup>30)</sup>, poly

(thionine)<sup>31)</sup>などの例が報告されているにすぎない。

azineの骨格構造は、phenazine, phenoxazine, phenothiazineに分類される。そこで本研究では、それぞれの骨格をもち側鎖の構造が類似している色素として Neutral red (NR), Brilliant Cresyl Blue (BCB), Toluidine Blue (TB)を用い (scheme 1), 電解重合膜の調製とその電気化学的特性について比較検討した。さらに、これらの膜によって修飾された電極にチロシナーゼを被覆し、有害な塩化フェノールのモデル化合物として用いた2,4-dichlorophenol (2,4-DCP)に対するセンサ応答特性、およびポリazine膜の電子メディエータ機能について検討した。



Scheme 1

## 2. 実験

### 2.1 試薬

Neutral RedとToluidine Blueは、関東化学(株)の特級試薬を、またBrilliant Cresyl BlueはSigma-Aldrich社の試薬をそのまま使用した。チロシナーゼ(from mushroom)はSigma社より、Nafion<sup>®</sup>はSigma-Aldrich社より、またL-tyrosineおよび2,4-dichlorophenolは東京化成工業(株)よりそれぞれ購入した。その他の無機塩類などはすべて関東化学(株)の特級試薬を使用した。また電解液や緩衝液などの調製には超純水を使用した。

### 2.2 電気化学測定装置

電解重合およびサイクリックボルタモグラム(CV)測定には、BAS社のCV-50Wエレクトロケミカルアナライザーを用いた。また定電位応答測定には北斗電工(株)のポテンショスタットHA1010mM2Bを使用した。測定法は3電極法とし、対極には自作のPt線電極

を、また参照電極には、3M NaCl を電解液とする Ag/AgCl 電極 (BAS, RE-1B) を使用した。測定セルはジャケットに恒温水を流すことにより 25°C に保持した。必要な場合には電解液にあらかじめ N<sub>2</sub> ガスを約 15 min 流して脱 O<sub>2</sub> 処理を行ったのち、そのまま N<sub>2</sub> 気流下で実験を開始した。

## 2. 3 電解重合

電極には直径 5mm, 長さ約 30mm の炭素棒 (日立化成(株), spectroscopic graphite) を用い、電極面を紙やすり、さらにアルミナ懸濁液 (1μm) で研磨したのち、超純水中で超音波洗浄を行った。電極の側面は、テフロンシールテープおよびシリコンチューブで覆った。0.1M NaCl を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を電解液とし、N<sub>2</sub> 雰囲気下で CV 測定を行うことにより、電極面の清浄化を確認した。

電解重合に用いる色素モノマー溶液の pH は、重合の起こりやすさに強い影響を及ぼすことが報告されている<sup>14)</sup>。そこで本研究では、TB と BCB については弱アルカリ性の 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.1) を、また NR については従来の研究で最適とされたほぼ中性の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を用い、色素モノマーの濃度はいずれも 0.4mM とした。さらに支持電解質として 0.1M NaNO<sub>3</sub> を加えた。重合反応は N<sub>2</sub> 雰囲気下で電位掃引法を用い、掃引範囲 -0.8 ~ +0.8V (*vs.* Ag/AgCl), 掃引速度 0.1V/s, 掃引回数 10 回の条件で行った。掃引終了後、0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を用いて十分に洗浄し、あらためて CV 測定を行うことにより、重合膜の生成を確認した。

## 2. 4 センサの作製

電極上にのせるチロシナーゼの活性量を調べるために、酵素活性の測定を行った。基質溶液は 0.2mM L-チロシン / 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.5) とし、酵素溶液は 3mg/mL の濃度で調製し、遠心分離機にかけて上澄を使用した。基質溶液に酵素溶液を加えて反応を開始し、280nm における吸光度の変化より  $\Delta A_{280} = 0.001/\text{min} = 1\text{U}$  としてユニット数を求めた。

ポリ azine 膜で被覆された電極面に、マイクロシリンジを用いて酵素溶液 (約 17U を含む) を数回に分けて塗布し、冷蔵庫中で乾燥させた。最後に酵素の漏出を防ぐために、0.5% Nafion 溶液 20μL を同様に数回に分けて塗布し、冷蔵庫中で 12h 乾燥させた。

## 2. 5 センサ応答測定

0.1M NaCl を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を電解液とし、30% エタノールで調製した 0.1M DCP を基質溶液とした。ポテンシオスタットによりセンサ電極に +0.5V (*vs.* Ag/AgCl) の電位を印加し、基質溶液を 50μL ずつ 5 回加え、3 電極法によりステップ応答を測定した。

## 3. 結果および考察

### 3. 1 電解重合膜の作製とその電気化学的性質

Fig. 2 (a)~(c) にそれぞれ NR, BCB, および TB の電解重合に伴うボルタモグラムの変化を示す。NR の場合、-0.49V と -0.56V 付近にそれぞれ酸化および還元ピーク電位をもつモノマーの波形が急速に減少し、ほぼ同じ電位付近にピーク電位をもつポリマーの波形が掃引回数とともに徐々に増大することが分かる。BCB の場合、-0.29V と -0.38V 付近にそれぞれ酸化および還元ピークをもつモノマーの波形は、NR の場合に比べるとややゆっくりと減少していき、モノマーよりかなり正側にピーク電位をもつポリマーの波形が増大していく。TB の場合、モノマーの酸化および還元ピークは、それぞれ -0.26V および -0.37V 付近にみられ、ポリマーの形成に伴う波形の変化は、BCB の場合と類似していることが分かる。このような挙動の違いは、それぞれの骨格構造やモノマー溶液 pH の違いによると考えられる。

Fig. 3 は得られたポリ azine 修飾電極の CV を比較したものである。また、これらのボルタモグラムより求めた電気化学特性および被覆量を Table 1 に示す。みかけの酸化還元電位  $E_p^*$  は、酸化ピーク電位  $E_p(\text{ox})$  と還元ピーク電位  $E_p(\text{red})$  から  $E_p^* = (E_p(\text{ox}) + E_p(\text{red}))/2$  として求めたものである。モノマーとポリマーの  $E_p^*$  の値を比較すると、いずれの色素についてもポリマーになると正側にシフトしていることがわかる。また、 $E_p^*$  の値の順序はポリマーでも変わらず、ポリ (TB) > ポリ (BCB) > ポリ (NR) となっており、この順で還元され易いことを示す。これは、置換基の構造はほぼ類似していることから、主に azine 骨格の違いによるものであろう。単位面積当りの被覆量は、電極面積を 0.2cm<sup>2</sup> として酸化ピーク面積より算出したものである。Table 1 の結果は、ポリ (TB) の酸化還元活性種の濃度だけが特に高いことを示唆するが、その理由についてはわかっていない。

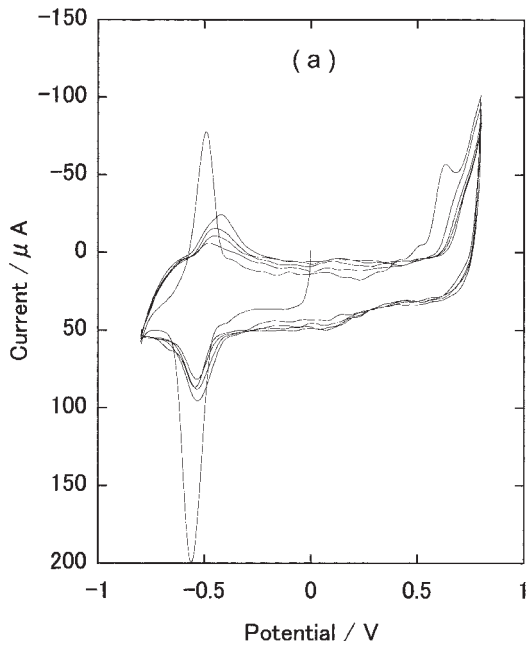


Fig. 2(a)

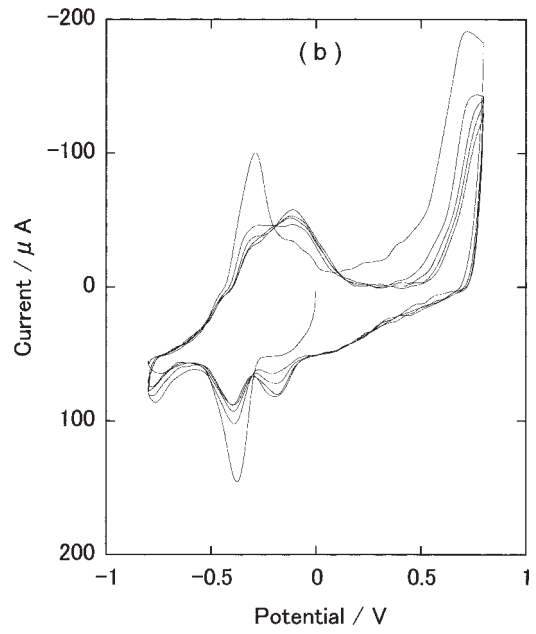


Fig. 2(b)

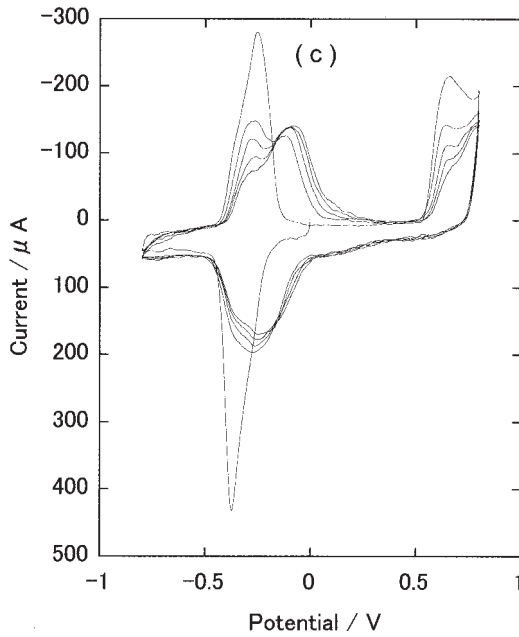


Fig. 2(c)

Fig. 2 Cyclic voltammograms reflecting the growth of polyazines layer from NR (a), BCB (b), and TB (c) solutions, recorded at 0.1V/s in 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 containing 0.1M  $\text{NaNO}_3$ (a), and 0.1M borate buffer pH 9.1 (b and c).

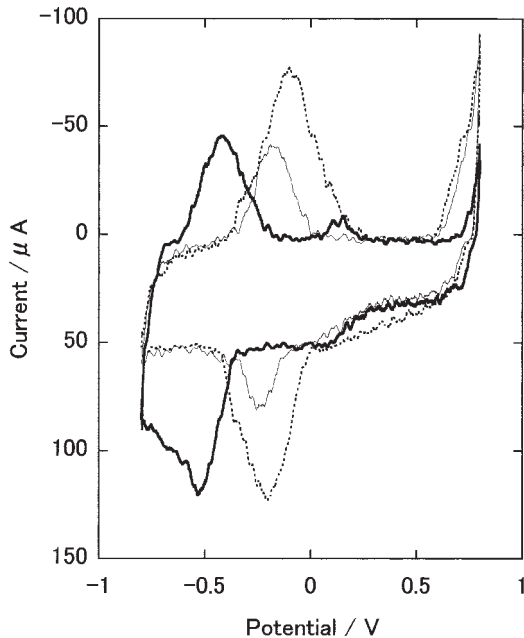


Fig. 3 Comparison of the cyclic voltammograms observed for electropolymerized NR (—), BCB (---), and TB (.....).

Table 1. Electrochemical properties of electropolymerized NR, BCB, and TB.

Dye	monomer		polymer		Surface coverage [nmol·cm <sup>-2</sup> ]
	$E_F^\circ$ [V]	$E_p(\text{ox})$ [V]	$E_p(\text{red})$ [V]	$E_F^\circ$ [V]	
NR	-0.53	-0.43	-0.53	-0.48	5.70
BCB	-0.33	-0.18	-0.24	-0.21	4.43
TB	-0.31	-0.11	-0.20	-0.16	12.5

### 3. 2 センサ応答特性

基質濃度を段階的に増大させたときのステップ応答曲線の例を Fig. 4 に示す。2,4-DCP を加えるごとにアノード電流が増大し、センサ応答を示すことがわかる。基質を注入してから定常電流値に達するまでに要する応答時間は、ポリ (NR) とポリ (TB) 修飾電極では 1 min 以下でかなり短い、ポリ (BCB) 修飾電極では 2 min 以降でも徐々にではあるが電流の増大が認められた。そこで本研究では注入前と 2min 後の電流値との差を応答電流とみなすことにした (Table 2)。応答電流と 2,4-DCP 濃度との関係を示す検量線を Fig. 5 に示す。いずれの電極においても良好な直線関係を示すことがわかる。未修飾電極は、炭素電極表面に直接、酵素溶液を塗布することにより作製したものである。図

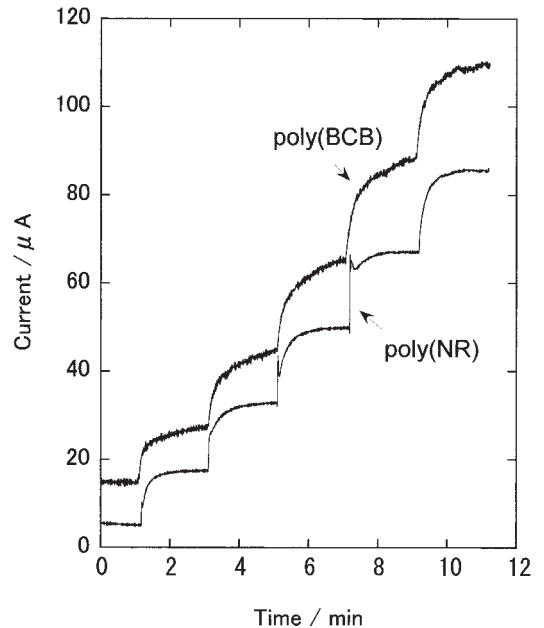


Fig. 4 Current-time relationships for polyazine-modified tyrosinase electrodes with stepwise addition of 2, 4-DCP.

Table 2. Sensor response against 2, 4-DCP for polyazine-modified tyrosinase electrodes.

2, 4-DCP /mM	Response current / $\mu\text{A}$			
	Unmodified	Poly (NR)	Poly (BCB)	Poly (TB)
0.33	0.10	0.13	0.13	0.03
0.67	0.20	0.28	0.31	0.06
1.00	0.33	0.45	0.52	0.09
1.33	0.47	0.62	0.74	0.12
1.67	0.62	0.80	0.95	0.15
r	0.9943	0.9972	0.9940	0.9996

より、ポリ (BCB) とポリ (NR) で修飾したセンサ電極では応答電流が増大しており、センサ応答の基礎となる酵素反応が促進されることを示唆している。これに対し、ポリ (TB) 修飾センサでは、応答感度がかなり低下することが分かる。その原因については、上述のポリマー被覆量の結果をみるとポリ (TB) は他の色素ポリマーに比べてかなり多量に付着している可能性があり、非導電性の厚い膜が形成されたために電気抵抗が増大し、結果として電流値が低下したものと考えられる。このことは、高感度のセンサを作製するにはポリマー被覆量に最適な量が存在することを示唆す

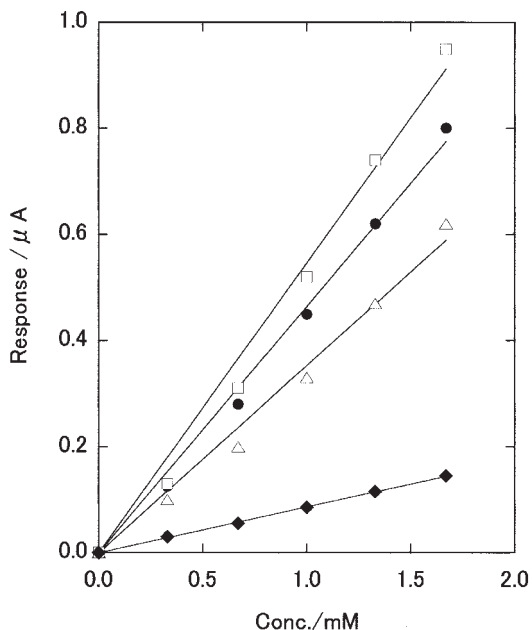


Fig. 5 Calibration plots for 2, 4-DCP obtained with unmodified ( $\Delta$ ), poly (NR) ( $\bullet$ ), poly (BCB) ( $\square$ ), and poly (TB) ( $\blacklozenge$ )-modified tyrosinase electrodes.

る。

### 3. 3 電子メディエータとしての可能性

ポリ azine 膜によって電極表面を被覆することにより酵素反応が促進されることは、生体触媒電極反応が生じている可能性がある。Fig. 1 に示したように、電極触媒反応には二つのタイプがあり、直接電子移動型は導電性ポリマーなどで被覆した電極などで、またメディエータ型は電極と酵素分子の間に適当な酸化還元性物質を介在させた電極などで生じることが知られている。本研究ではポリ azine 膜の導電性については検討していないが、ポリ (TB) 膜修飾電極におけるセンサ応答の結果を考え合わせると、ポリ azine 膜は非導電性の可能性が高いと考えられる。そこでもう一つの可能性として考えられる電子メディエータとしての機能について検討した。

Fig. 6 は、ポリ (NR) 膜修飾電極で作製したセンサを用い、基質 (2,4-DCP) を加えたときの CV の変化を示したものである。+0.16V と 0V 付近に酸化および還元ピークを示す酸化還元波は、基質の添加量とともに増大するが、未修飾電極を用いたセンサの場合に

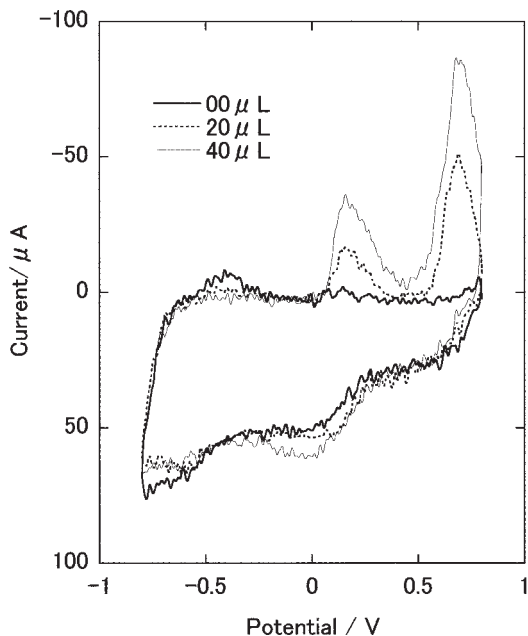


Fig. 6 Change of the cyclic voltammogram for poly (NR)-modified tyrosinase electrode with addition of 2, 4-DCP.

も同様な波形の変化がみられることから、生成物のカタコールによるものと考えられる。また +0.7V 付近にみられる酸化ピークも増大するが、これは生成したカタコールがさらに酸化されてポリマーを形成する反応によるものであろう。これに対し、ポリ (NR) の酸化還元波は酵素分子を塗布するとかなり減少してしまい、基質を加えたときの変化はほとんどみられなかったため、メディエータとして機能することを明らかにするには至らなかった。またポリ (BCB) 膜修飾電極で作製したセンサについてもほぼ同様な結果であった。今回の応答測定は溶存  $O_2$  の存在下で行ったものであり、酵素のターンオーバーがメディエータばかりでなく  $O_2$  によっても起こるため、メディエータの効果が顕著に現れなかったのであろう。そこで今後、除  $O_2$  処理を行った嫌気的条件下での測定を行い、ポリ azine 膜の電子メディエータとしての機能について検討する計画である。

### 4. 結 語

phenazine, phenoxazine, および phenothiazine という 3 種の基本骨格をもつ azine 系酸化還元色素として

側鎖構造の類似した NR, BCB, および TB をそれぞれ選び、電解重合法により炭素電極表面にポリ azine 膜を形成させた。その結果、いずれも酸化還元電位がモノマーよりわずかに正側にシフトするが、モノマーと同様に良好な酸化還元挙動を示す膜が形成できることがわかった。また、ポリ azine 膜の上に酵素チロシナーゼをのせて作製したセンサは、有害な塩化フェノールのモデルとして用いた2,4-DCP に対してセンサ応答を示すことがわかった。ポリ (NR) およびポリ (BCB) 修飾電極を用いて作製したセンサでは、未修飾の場合に比べて応答電流の増大がみられ、これらの膜が電子メディエータとして機能することが示唆されたが、基質の添加に伴う色素膜の酸化還元波には大きな変化は認められず、メディエーションの確認には至らなかった。電解重合法による酸化還元活性なポリマーの作製に関する研究は、まだ開始されたばかりであり、バイオセンサ用信号変換素子の新しい作製法として期待される。

## 謝 辞

本研究は、文部科学省より私立大学学術研究高度化推進事業ハイテクリサーチセンター (2005-2009) の助成を受けて行われた。

## 参考文献

- 1) R. Garjonyte and A. Malinauskas: *Sensors and Actuators, B*, 63 (2000) 122.
- 2) R. Garjonyte and A. Malinauskas: *Biosens. Bioelectron.*, 15 (2000) 445.
- 3) W.J. Sung and Y.H. Bae: *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2177.
- 4) S. Reiter, K. Habermüller, and W. Schuhmann: *Sensors and Actuators, B*, 79 (2001) 150.
- 5) L. Cen, K.G. Neoh, and E.T. Kang: *Biosens. Bioelectron.*, 18 (2003) 363.
- 6) Y.-M. Uang and T.-C. Chou: *Biosens. Bioelectron.*, 19 (2003) 141.
- 7) P. Mailley, E.A. Cummings, S. Mailley, S. Cosnier, B.R. Eggins, and E. McAdams: *Bioelectrochemistry*, 63 (2004) 291.
- 8) S.E. Stanca and I.C. Popescu: *Bioelectrochemistry*, 64 (2004) 47.
- 9) K. Ban, T. Ueki, Y. Tamada, T. Saito, S. Imabayashi, and M. Watanabe: *Anal. Chem.*, 75 (2003) 910.
- 10) J.-Z. Xu, J.-J. Zhu, Q. Wu, Z. Hu, and H.-Y. Chen: *Electroanalysis*, 15 (2003) 219.
- 11) D. Shan, C. Moustrey, S. Cosnier, and S. Mu: *Electroanalysis*, 15 (2003) 1506.
- 12) F. Tian and G. Zhu: *Sensors and Actuators, B*, 97 (2004) 103.
- 13) A.A. Karyakin, A.K. Strakhova, E.E. Karyakina, S.D. Verfolomeyev, and A.K. Yatsimirsky: *Bioelectrochem Bioenerg.*, 32 (1993) 35.
- 14) A.A. Karyakin, E.E. Karyakina, and H.-L. Schmidt: *Electroanalysis*, 11 (1999) 149.
- 15) B. Wang, J. Zhang, and S. Dong: *Biosens. Bioelectron.*, 15 (2000) 397.
- 16) M.D. Rubianes, and G.A. Rivas: *Electroanalysis*, 12 (2000) 1159.
- 17) Z. Liu, B. Liu, J. Kong, and J. Deng: *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4707.
- 18) M.C. Rodríguez, and G.A. Rivas: *Anal. Chim. Acta*, 459 (2002) 43.
- 19) H. Notsu, T. Tatsuma, and A. Fujishima: *J. Electroanal. Chem.*, 523 (2002) 86.
- 20) S.C. Chang, K. Rawson, and C.J. McNeil: *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 1015.
- 21) J. Yu, S. Liu, and H. Ju: *Biosens. Bioelectron.*, 19 (2003) 509.
- 22) B. Serra, A.J. Reviejo, and J.M. Pingarrón: *Anal. Lett.*, 36 (2003) 1965.
- 23) H. Notsu and T. Tatsuma: *J. Electroanal. Chem.*, 566 (2004) 379.
- 24) V. Carralero Sanz, M. Luz Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, and J.M. Pingarrón: *Anal. Chim. Acta*, 528 (2005) 1.
- 25) Z. Liu, Y. Liu, H. Yang, G. Shen, and R. Yu: *Anal. Chim. Acta*, 533 (2005) 3.
- 26) A. Gutiérrez, F. Céspedes, S. Alegret, and M. del Valle: *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 1668.
- 27) J. Kulys and R.D. Schmid: *Anal. Lett.*, 23 (1990) 589.
- 28) M. Hedenmo, A. Narváez, E. Domínguez, and I. Katakis: *J. Electroanal. Chem.*, 425 (1997) 1.
- 29) J. Parellada, A. Narváez, M.A. López, E. Domínguez, J.J. Fernández, V. Pavlov, and I. Katakis: *Anal. Chim. Acta*, 362 (1998) 47.



- 30) H. Patel, X. Li, and H.I. Karan: Biosens. Bioelectron., 18 (2003) 1073.
- 31) E. Dempsey, D. Diamond, and A. Collier: Biosens. Bioelectron., 20 (2004) 367.