ノ ー ト

自己組織化単分子膜修飾電極を用いるドーパミンの選択的定量 と共存タンパクの影響

陳 智 棟¹, 長 岡 勉^{®2}

Selective determination of dopamine based on a self-assembled monolayer
electrode with antifouling activity on protein adsorption

Zhidong CHEN¹ and Tsutomu NAGAOKA²

¹ Department of Chemical Engineering & Technology, Jiangsu Polytechnic University, Baiyunlu, Changzhou, Jiangsu 213016, China

² Research Institute for Advanced Science & Technology, Osaka Prefecture University, 1-2, Gakuen-Cho, Sakai-shi, Osaka 599-8570

(Received 5 March 2004, Accepted 26 June 2004)

A self-assembled monolayer consisting of 3,3'-thiodipropionic acid and *n*-decyl mercaptan formed on a gold electrode was studied for a sensitive and selective determination of dopamine. The experimental results show that the monolayer exhibits both excellent sensitivity and stability, even in the presence of ascorbic acid and protein. A detection limit of 5.0×10^{-6} M for dopamine was obtained in flow injection analysis by the optimizing experimental conditions, such as the solution pH, flow velocity of the carrier solution and the electrode potential. The current response of the modified electrode showed excellent stability in the presence of 0.2% albumin. Even with ascorbic acid in 10-fold excess, dopamine could be detected within an error of about 3%.

Keywords : self-assembly electrode; amperometric flow-injection analysis; dopamine; ascorbic acid; protein adsorption.

1 緒 言

化学修飾電極を用いる神経伝達物質の測定に関心が集まっている。哺乳類中枢神経システムにおいて、神経伝達物質として機能するドーパミンはの中で重要な物質の一つである。しかし、電気化学的にドーパミンを測定することは、共存するアスコルビン酸の影響を受けるために一般に困難である。これは、アスコルビン酸の酸化電位がドーパミンに近い上、通常中枢神経の細胞内に存在するアスコルビン酸はドーパミンに比べて濃度が高いためである。

この困難を克服するため、既に様々な方法が報告されているが、修飾電極はドーパミンの相対感度を高める手段と

して有望であると思われる^{1)~9)}。ポリピロールの過酸化により作製されたイオン交換膜修飾電極を用いることで、ドーパミンを選択的に測定することができると報告されている^{5)~7)}。Wang らは同じ原理に基づいて、負電荷を持つ Eastman-AQ55D ポリマーでグラシーカーボン電極を修飾することにより、ドーパミンを選択的に測定している⁸⁾。Mandler らは、自己組織により $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ を金電極に修飾して、ボルタンメトリーによりドーパミンを選択的に測定する方法を報告した⁹⁾。この電極がドーパミンを選択する理由として、単分子膜 $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COO}^-$ がアスコルビン酸陰イオンを反発するためと説明されている。

電気化学的手法によりドーパミンを測定する場合、更に考慮すべき点はタンパクの電極への吸着の影響である。タンパク共存下において、高分子膜修飾電極を用いたドーパミンの定量に関する報告が幾つかなされている。例えば、

¹ 江蘇工業学院化学工程系: 213016 中国江蘇省常州市白雲路

² 大阪府立大学先端科学研究所: 599-8570 大阪府堺市学園町 1-2

Nafion 膜あるいはポリエチレングリコールで修飾したグラシーカーボン電極は、タンパクの吸着に効果があると報告されている^{10)~12)}。Wilson らは、過酸化水素の定量において酢酸セルロース修飾白金電極を用いると、アルブミンの存在下においても安定な電流が得られることを示した。しかし、修飾電極上での過酸化水素電流は未修飾電極と比べ、約 50% に低下した¹³⁾。このような電極では多くの場合修飾に伴う感度低下が認められ、それは基質の膜内拡散速度によると考えられている。

これに対して、自己組織単分子膜の場合、電流の損失はチオールの分子鎖長 $-(CH_2)-$ に依存すると考えられ、高分子膜のような欠点を避けることも可能と思われる。しかし、タンパク共存下において、自己組織単分子膜修飾電極を用いたドーパミンの選択的定量に関する研究はあまり行われていない。著者らは、金電極上に修飾した 3,3'-チオジプロピオン酸 $\{HS(CH_2CH_2COOH)_2\}$ と *n*-デシメルカプタン (HSC10) から成る複合単分子膜がタンパク共存下においても銅イオンに対して選択的に応答することを報告した¹⁴⁾。そこで本研究では、同じ構成の単分子膜を用い、タンパク共存下におけるこの電極の挙動について検討した。

2 実験

2.1 試薬

ドーパミン、アスコルビン酸、3,3'-チオジプロピオン酸 (TPA) 及びデシメルカプタン (HSC10) は東京化成製特級を用いた。牛アルブミン (和光純薬製) は 95% 純度のものを用いた。他の試薬はすべて特級を使用した。水は Milli-Q システムにより精製した。

2.2 装置

ボルタンメトリーの測定において、作用極は金電極 (直径 1.6 mm, BAS 製)、対極には白金線 (直径 1 mm, 長さ 8 cm)、参照電極には飽和銀塩化銀電極を用いた。本論文で示される電位は、すべてこの電極を参照している。測定は EG&G Model 263A ポテンシostat を用い、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ において行った。フローインジェクション法では定速ポンプ (島津製 LC-6A) を使用して、移動相の流量は 0.5 ml min^{-1} とした。すべての実験で試料の注入量は $20 \mu\text{l}$ であった。

2.3 電極の修飾

金電極は、直径 0.5 及び $0.3 \mu\text{m}$ のアルミナ粒子による研磨の後、混酸溶液中 ($\text{HCl} : \text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O} = 3 : 1 : 16$) で処理した。この金電極を水で洗浄後、20 mM ($M \equiv \text{mol dm}^{-3}$) TPA と 20 mM HSC10 から成るメタノール溶液中に 12 時間浸し修飾を行った。フローインジェクション分

Fig. 1 Cyclic voltammograms of dopamine and ascorbic acid at (A) a bare gold electrode and (B) a TPA + HSC10 modified gold electrode in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at a scan rate of 40 mV s^{-1} (a) 1.0 mM dopamine; (b) 1.0 mM ascorbic acid

析に用いたラジアルフローセル金電極 (直径 3 mm, BAS 製) の修飾も同じ方法で行った。電極の安定性 (使用回数) を検討するときには、電極はリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中に保存した。

3 結果及び考察

3.1 ボルタンメトリー

Fig. 1 は未修飾及び修飾電極上における 1.0 mM ドーパミン及びアスコルビン酸のサイクリックボルタンメトリーを示している。TPA の解離定数は 4.2 と 5.2 であるので、修飾電極を pH 7.4 のリン酸緩衝溶液中に置くと、電極表面上の TPA は二つのプロトンを解離して負電荷を持つと考えられる¹⁵⁾。同様に pH 7.4 の溶液中で、ドーパミン ($pK_1 = 4.25$, $pK_2 = 11.57$) は陽イオンであり、アスコルビン酸は陰イオンである。Fig. 1 に示すように、未修飾金電極の場合にはドーパミン及びアスコルビン酸はいずれも酸化ピークを示したが、修飾電極ではアスコルビン酸の酸化電流は観測されなかった。これは、アスコルビン酸が負に帯電した単分子膜によって電極表面に十分に接近できなかったためと考えられる。ドーパミンは陽イオンであるのでこの単分子膜に近づくことができ、可逆度は減少するも

Fig. 2 Peak current ratio (dopamine/ascorbic acid) at a TPA + HSC10 modified electrode as a function of the applied potential

Dopamine and ascorbic acid concentrations were 10 μM and 1.0 mM, respectively. Flow rate: 0.5 ml min^{-1} ; Carrier solution: 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)

の酸化電流を示したものと思われる。可逆度の減少については現時点では明らかでないが、単分子膜のち密さが原因の一つと考えられる。

3.2 最適化

ドーパミンの定量に関する検討は、フローインジェクション分析で行った。流量 0.50 ml min^{-1} において、リン酸緩衝溶液をキャリアー溶液として用い、20 μl の試料を注入した。まず、ドーパミンの酸化電流に及ぼすキャリアー溶液 pH の影響を検討した。+0.50 V において pH を 4.3, 5.6, 6.4, 7.4 と変化させたとき、ドーパミンの酸化電流値は pH 7.4 のときに最も大きかった。このことより、以後の実験においては pH 7.4 を使用した。次に、ドーパミンのピーク電流に及ぼすアスコルビン酸の影響について検討を行った。10 μM ドーパミン及び 1.0 mM アスコルビン酸混合溶液を注入したところ、ピーク電流比（ドーパミン/アスコルビン酸）は、Fig. 2 に示すように、+0.50 V において最も大きかった。したがって、以後の実験はすべて +0.50 V で行った。ピーク電流値はキャリアーの流量が大きくなると小さくなり、逆に小さいとピーク幅の増大が認められたので、0.50 ml min^{-1} 付近が最適と判断した。

3.3 検出限界及び再現性

pH 7.4 の 0.1 M リン酸緩衝水溶液をキャリアー溶液とし、0.50 ml min^{-1} で 10~500 μM までのドーパミンを注入した。このとき、電流は濃度と比例関係にあり、相関係数 r は 0.996 であった。S/N = 2 を検出限界とすると、直

Table 1 Relative errors in dopamine determination on varying ascorbic acid concentration; [dopamine] = 50 μM ($n = 3$)

Ascorbic acid concentration/ mM	Current/ μA	Relative error, %
0	3.31	—
0.050	3.33	0.6
0.10	3.35	1.2
0.20	3.36	1.5
0.50	3.42	3.3
0.80	3.49	5.4
1.0	3.56	7.6

流検出法の場合ドーパミンに関して約 5.0 μM であった。また 3 日間に計 9 回の 10 μM ドーパミンの定量を行った結果、電流値の相対標準偏差は 2.8% であり、安定な結果を示した。以上の結果からこの修飾電極でかなり良い再現性と安定性が得られることが分かった。また、別個に作製した 5 本の電極を用いてドーパミンのピーク電流値を測定したところ、その標準偏差は 1.5% であり、再現性の良い膜が作製されていることが分かった。

3.4 アスコルビン酸とタンパクの影響

共存するアスコルビン酸の影響を検討するために、異なる濃度のアスコルビン酸を含む 50 μM ドーパミン混合溶液を注入した。Table 1 に示すように、10 倍のアスコルビン酸が存在すると電流値に約 3% の誤差が生じたが、この結果は Nafion 膜（5 倍のアスコルビン酸に対して約 4% の誤差）の結果より優れていた¹⁶⁾。

通常ドーパミンはタンパクと共存しているので、その影響に対する検討は重要である。Fig. 3 は 0.2% のアルブミンを含む 50 μM ドーパミン溶液を連続的に 60 回注入したときの結果を示している。両方の実験において、最初の 1 回の注入はアルブミンを含まないドーパミン溶液に対する応答を示している。このとき、未修飾金電極では修飾金電極より約 1.5 倍大きな応答が得られたが、アルブミンを含むドーパミン溶液を注入すると急速に活性が失われた。30 回以後は電流値の変化は小さくなったが、応答は極めて小さくなった。これはアルブミンが裸の金表面に吸着するためと考えられる。これに対し修飾電極では電流の減少も小さく、また、アルブミン存在下でも感度はほとんど一定であり、安定した応答が得られた。この結果からアルブミンが存在してもこの修飾電極でドーパミンを定量することができると考えられる。著者らは、水晶振動子マイクロバランスを用い、修飾電極へのアルブミン吸着量は未修飾電極の約 10% であることを報告した¹⁴⁾。単分子膜がかなりの程度アルブミンの吸着を阻止できることは、その等電点及び疎水性から考えれば説明できる。アルブミンの等電

Fig. 3 Peak current responses at +0.5 V vs. Ag/AgCl (sat.) on (a) bare and (b) TPA + HSC10 modified electrodes for repeated injections of a 50 μ M aqueous dopamine solution containing 0.2% albumin

The other experimental conditions were the same as in Fig. 2.

点は5.2であり、pH 7の溶液においては、アルブミンは負電荷を帯びている。このため、その吸着はTPA単分子膜により阻止される。また、疎水性のアルブミンは親水性のTPA膜表面に吸着しにくいと考えられる¹⁷⁾。

以上の結果から、この自己組織単分子膜はドーパミンの

選択的定量が可能であり、またタンパクの吸着を効果的に阻止でき、しかも安定性に優れていることが分かった。

文 献

- 1) D. M. Zhou, H. X. Ju, H. Y. Chen: *J. Electroanal. Chem.*, **408**, 219 (1996).
- 2) T. F. Kang, G. L. Shen, R. Q. Yu: *Anal. Chim. Acta*, **356**, 245 (1997).
- 3) M. Freund, L. Bodalbhai, A. Brajter-Toth: *Talanta*, **38**, 95 (1991).
- 4) J. M. Zen, P. J. Chen: *Anal. Chem.*, **69**, 5087 (1997).
- 5) Z. Q. Gao, M. X. Zi, B. S. Chen: *J. Electroanal. Chem.*, **373**, 141 (1994).
- 6) Z. Q. Gao, B. S. Chen, M. X. Zi: *Analyst*, **119**, 459 (1994).
- 7) Z. Q. Gao, M. X. Zi, B. S. Chen: *Anal. Chim. Acta*, **286**, 213 (1994).
- 8) J. Wang, T. Golden: *Anal. Chem.*, **61**, 1397 (1989).
- 9) F. Malem, D. Mandler: *Anal. Chem.*, **65**, 37 (1993).
- 10) B. Hoyer, T. M. Florence, G. E. Batley: *Anal. Chem.*, **59**, 1608 (1987).
- 11) B. Hoyer, T. M. Florence: *Anal. Chem.*, **59**, 2839 (1987).
- 12) H. Maeda, M. Itami, K. Katayama, Y. Yamauchi, H. Ohmori: *Anal. Sci.*, **13**, 721 (1997).
- 13) S. Sittampalam, G. S. Wilson: *Anal. Chem.*, **55**, 1608 (1983).
- 14) T. Nagaoka, Z. Chen, H. Okuno, M. Nakayama, K. Ogura: *Anal. Sci.*, **15**, 857 (1999).
- 15) S. Bharathi, V. Yegnaraman, G. Prabhakara Rao: *Langmuir*, **11**, 666 (1995).
- 16) J. Wang, L. D. Hutchins: *Anal. Chem.*, **57**, 1536 (1985).
- 17) Jun-ichi, Anzai, B. Guo, T. Osa: *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **45**, 285 (1996).