ポリイオンコンプレックス複合電解重合絶縁性ポリ-1-アミノピロールを用いたポテンシヨメトリックアセチルコリンセンサの作製

桑原 貴之^a, 山川 直子^a, 門間 聰之^b, 逢坂 哲彌^{*.a}

^a 早稲田大学理工学部 (〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1)

^b 早稲田大学各務記念材料技術研究所 (〒169-0051 東京都新宿区西早稲田 2-8-26)

Preparation of Potentiometric Acetylcholine Sensor Using Electropolymerized Insulating Poly-1-Aminopyrrole with Polyion Complex

Takayuki KUWAHARA,^a Naoko YAMAKAWA,^a Toshiyuki MOMMA,^b and Tetsuya OSAKA^a

^aDepartment of Applied Chemistry, School of Science and Engineering, Waseda University (3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan)

^bKagami Memorial Laboratory for Materials Science and Technology, Waseda University (Shinjuku-ku, Tokyo 169-0051, Japan)

Received February 26, 2001 ; Accepted March 23, 2001

A potentiometric acetylcholine microsensor was fabricated by use of a composite film consisting of polyion complex (PIC), which consisted with acetylcholine esterase (AChE), and the electrochemically inactive poly-1-aminopyrrole (iPAPy). The iPAPy-PIC (AChE) composite film on Pt electrode displayed potential response to acetylcholine concentration owing to pH change during the enzymatic reaction, where the product contains weak acid CH_3COOH . The sensitivity of the iPAPy-PIC (AChE) electrode clearly demonstrated higher sensitivity with low detection limit ($1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) than that of the iPPy-PIC (AChE) electrode of detection limit ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). The mechanism of increasing the sensitivity of iPAPy-PIC (AChE) electrode was discussed the interaction of $-\text{NH}_2$ of iPAPy with CH_3COOH , which would accelerate the dissociation of weak acid CH_3COOH .

Key Words : Potentiometric Acetylcholine Sensor, Electropolymerization, Poly-1-Aminopyrrole

1 緒 言

ポリピロールは代表的な導電性高分子の一つであり電解酸化重合法により合成が可能であるが、求核性試薬の存在下で貴な電位の印加により絶縁性ポリピロール膜 (iPPy) を作製することが可能である¹⁻³⁾。また作製条件の選択により膜導電率や膜厚を制御可能である²⁾。iPPy はポリピロールの過酸化により生成されるが、膜の成長中に導電性を有しているところに選択的に過酸化電流が流れることにより、自動的にピンホールを補修して完全に均一な連続膜として成膜されることが特徴であり、導電性電極上にリソグラフィー技術により形成した $50 \mu\text{m}\phi$ の微小な穴に成膜することで、歩留まり良く液晶ディスプレイの MIM スイッチング素子として大面積に多数形成する事が可能であった⁴⁾。さらに MIM 素子作製工程での真空成膜条件でスパッタした材料で挟み込んだ構造でも安定して作動し、化学的・物理的に非常に安定な膜であることが示されている¹⁾。

またこのような微小部分への均一成膜という利点を応用し、iPPy のイオン応答特性を検討した結果、iPPy は pH に対して良好な電位応答を示し、更に pH 以外の他のイオンによる電位変化が無いことを確認している⁵⁾。さらにこの iPPy が

pH に対し良好な電位応答をすることを利用し、pH 変化を伴う酵素反応と組み合わせたマイクロセンサの構築を検討してきた⁶⁻⁸⁾。

ウレアーゼと iPPy を組み合わせた場合、(1)式のように尿素はウレアーゼにより分解され、 H^+ 又は OH^- の濃度変化は iPPy により ΔE (電位変化) として出力された。

ここで、 $\Delta[\text{H}^+]$ が大きいほど ΔE は大きく変化し、 ΔE から尿素濃度が決定できるわけである。酵素固定にはポリイオンコンプレックス (PIC) 膜が利用されている。さらに本方式を応用して、クレアチニン⁷⁾、アルギニン⁸⁾などを被測定物としたバイオセンサが作製可能であることを示してきた。いずれも電位検出型で通常考えられるネルンスト応答とはメカニズムが異なり、効果的に基質を検出でき、感度の高い検出が可能であった。本報では、この検出に基づきアセチルコリン検出の可能性を試みた。

アセチルコリン (ACh) はアセチルコリンエステラーゼ (AChE) で次のような酵素反応により分解される。

アセチルコリンセンサは主としてアンペロメトリー型⁹⁻¹¹⁾、ポテンシオメトリー型¹²⁾の2つの方法に分けられる。そのうちほとんどのセンサでは(2)式の反応にひき続き、コリンオキシダーゼ(ChOx)により生成するH₂O₂を検出するアンペロメトリー型である。

この方法では(3)式で生成したH₂O₂を酸化するのに高い電位をかける必要があり、共存するアスコルビン酸など酸化が容易な物質の影響を受けやすい。一方、(2)式におけるΔ[H⁺]のみをiPPyで検出するという方式は、生成物が弱酸であるが、原理的に可能であり、共存物質の影響を受けにくいと考えられる。そこで、本概念に基づくマイクロバイオセンサ作製を試みることにした。アセチルコリンの細胞内濃度は非常に低く、センサとしては1 μmol dm⁻³以下の低濃度測定が必要となる。そこで(2)式で生成する弱酸の解離度を上げることでこのシステムの高感度化が期待される。本研究では、弱酸生成物の解離度を上げる可能性を考えアミノ基をpH測定電極表面に固定するべく、1-アミノピロールを用いて、iPPyと同じように絶縁性ポリ-1-アミノピロール(iPAPy)として重合し、iPPyと比較しながら、アセチルコリンセンサとして作動するための可能性を検討したので、ここに報告する。

2 実験

2.1 不活性ポリ-1-アミノピロール(iPAPy)および不活性ポリピロール(iPPy)の重合

Ptディスク電極(1 mmφ)にiPAPyを重合する前処理として0.5 mol dm⁻³ H₂SO₄溶液中、-0.2~+1.2 V vs. Ag/AgCl, 0.5 V/sで電位掃引を行った。次に0.25 mol dm⁻³ 1-アミノピロール(東京化成), 0.05 mol dm⁻³ NaHCO₃からなる重合液, 0.25 mol dm⁻³ ピロール(和光純薬), 0.05 mol dm⁻³ NaHCO₃からなる重合液においてiPAPyおよびiPPyをそれぞれ1.25 V vs. Ag/AgCl, 5分間の条件で重合した。重合液は窒素により脱気し、窒素雰囲気下で重合反応を行った。全ての電気化学測定はポテンシostat/ガルバナスタットHA-501 G(北斗電工)を用いて行った。

2.2 iPAPy-酵素固定化PIC複合電極の作製

アセチルコリン(ACh)センサの電極は以下のような手順で作製した。上記のように電気化学的前処理を行ったPt電極上にすでに報告しているポリイオンコンプレックス(PIC)作製法に従って⁶⁻⁸⁾、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)(EC 3.1.1.7, 2.5 U mg⁻¹, Bovine erythrocyte由来, 和光純薬)を固定化した。すなわち、ポリアニオンであるポリビニルヒドロゲンフタレート(PHP)(東京化成), AChE, ポリカチオンであるポリ-L-リジン(PLL)(分子量: 75000, 和光純薬)を連続的にキャスト、乾燥した。溶液濃度はPHP, PLLは50 mmol dm⁻³, AChEについては15 mg dm⁻³とし、キャスト量はPHP, PLLは1 μl, AChEは2 μlとした。その後、iPAPy, iPPyそれぞれを前述と同条件で重合した。

SEMによる断面観察用の電極としてPt(50 nm)/SiO₂/Si基板を用いた。Si基板(信越半導体)上に熱酸化によりSiO₂層を200 nm作製し、その上にスパッタリングによりPt層を50 nm形成した。iPAPy, iPPyサンプルには予めPt/Pd蒸着を10 nm施した。SEMにはS-4500(日立)を用い、加速電圧は15 kVとした。

2.3 pHに対する電位応答の測定

iPPy, iPAPy電極のpHに対する電位応答測定は、フタル酸(pH 4.01), リン酸(pH 6.86), 炭酸(pH 10.01)緩衝液をそれぞれ3-6, 7-9, 10-12のpH領域で用いた。pHを所望の値に調整するためにH₂SO₄, あるいはNaOHを加えた。pH調整後に作用極を浸漬し、自然電位を測定した。

2.4 AChに対する電位応答測定

AChに対する電位応答は以下のような手順で測定した。

2.2で作製されたセンサ電極とAg/AgCl参照電極を37℃, 0.01 mol dm⁻³リン酸緩衝液中(pH約8)中に浸漬した。溶液をマグネットスターラーで攪拌し、続いて適量のアセチルコリン標準液を所定量滴下し、10秒で攪拌を止め電位測定を行った。測定は空気雰囲気下で行った。

2.5 酢酸溶液に対する電位応答測定

HCl, CH₃COOHそれぞれでpHを調節した場合の電位応答は以下の手順で行った。まず、センサ電極, Ag/AgCl参照電極, ガラス電極をNaCl溶液中(0.01 mol dm⁻³)に浸漬した。NaCl溶液のpHをHClあるいはCH₃COOHにより調節し、pH測定はガラス電極で行い、センサ電極の電位はエレクトロメータ(HA-501G, 北斗電工)で測定した。測定pH範囲は3.5~5.0とした。

3 結果および考察

3.1 iPAPyおよびiPPyの重合

Fig. 1aは0.05 mol dm⁻³のNaHCO₃, 0.25 mol dm⁻³の1-アミノピロールを含む水溶液中でのPt電極のサイクリックボルタモグラムである。第1回目のスキャンで0.2 V付近より酸化電流が流れ始め、0.5 V付近でピークが出現し一度電流は減少するが、0.8 V付近より再び電流が増加する。一般的に導電性を有し、電気化学的に活性なポリピロールで-0.1 V付近に見られるレドックス電流は見られない。また2回目以降のスキャンでは電流はほとんど流れていない。

我々はすでにピロールの電解重合において、NaHCO₃などの求核試薬の存在下で貴な電位を印加すると電気化学的に不活性な膜ができることを報告している¹⁻³⁾。これは求核試薬によりポリピロールのπ共役系が壊れ、カルボニル基が導入されるためと考えられる。このときのサイクリックボルタモグラムでは、第1回目のスキャンでは0.7 V, 1.0 Vにピークを持つ酸化電流が流れるが、2回目以降のスキャンではほとんど電流が流れていない。第1回目のスキャンの2つのピークは、はじめのピークはピロールの重合反応、次のピークは重合膜の酸化反応であることがすでに確認されている³⁾。Fig. 1aの1-アミノピロールの第1回スキャンはピロールの場合とほぼ同じ様な挙動であるため、0.5 V付近のピークで1-アミノピロールの重合が起こり、その膜が0.8 V付近から酸化され不活性化化すると考えられる。第2回目のスキャン以後、電流が流れていないのは電気化学的に不活性で絶縁性の膜が第1回目のスキャンで形成されているためであると考えられる。

Fig. 1 (a) Cyclic voltammograms on Pt and (b) a current-time profile applying 1.25 V vs. Ag/AgCl in 0.05 mol dm⁻³ NaHCO₃ aqueous solution containing 0.25 mol dm⁻³ 1-aminopyrrole. Numbers of successive cycling were illustrated in (a).

そこで、均一な膜を得るため絶縁性ポリ-1-アミノピロール (iPAPy) の重合を 1.25 V の定電位印加により行った。その時の電流と時間の関係を Fig. 1b に示す。電位印加直後に大電流が瞬間的に流れるが、それ以降は電流はほとんど流れない。この挙動はポリピロール重合の場合とほぼ同様であった。不活性な膜が成長すると同時に酸化が進み、膜の導電率が低下して電流が減少し、ある膜厚で反応が見かけ上止まり一定の膜厚となる。ここでは 28.8 mC cm⁻² で反応が停止している。

1-アミノピロールにおける挙動がピロールのそれと類似していることから 1.25 V の電位印加で、NaHCO₃ 中では重合と同時に過酸化プロセスが起こり絶縁性膜が成膜されていることと推察される。Fig. 2a および Fig. 2b に iPAPy および iPPy の重合された断面 SEM 像を示す。Pt 電極上に明らかに緻密な膜が重合されているが、iPAPy は iPPy に比べ膜厚は薄く 20 nm であった。一方、iPPy は 50 nm 程度で重合に要した電気量も 34.5 mC cm⁻² と多かった。

3.2 iPAPy の pH 応答測定

重合した iPAPy 膜の pH 応答を Fig. 3 に示す。参考までに iPPy 膜の応答も併記する。iPPy と同じように、iPAPy が緩衝液の種類に関わらず pH に対し良好な電位応答を示していることがわかる。iPAPy の傾きは 53 mV dec⁻¹ であった。この iPAPy を AChE を含むポリイオンコンプレックス膜と複合化することで ACh の分解により界面 pH 変化に対応し電位応答を示し、アセチルコリンセンサとして働く可能性があると考えられる。iPAPy の pH 応答のメカニズムは iPPy と同様であると考えられるが、詳細はまだわかっていない。

3.3 ACh 応答測定

Fig. 4a, 4b は iPAPy-PIC (AChE) 電極, iPPy-PIC (AChE)

Fig. 2 Cross-sectional SEM images of (a) iPAPy and (b) iPPy on Pt.

Fig. 3 pH-potential diagrams of iPAPy electrode. This iPAPy film was prepared by holding the potential at 1.25 V vs. Ag/AgCl for 5 min on Pt.

電極それぞれの ACh に対する電位応答を示している。両者ともに ACh の添加に伴って、電極電位は貴方向にシフトしており、また濃度が増えるにつれてその電位変化量も大きくなっている。Pt, iPAPy および iPPy それぞれの単独の電極は ACh に対して電位変化を示さないことを確認している。従って、この ACh 添加による電位の貴側へのシフトは(1)式で示したように、ACh の加水分解で生成した酢酸により界面 pH が小さくなったことに起因すると考えられる。すなわち、酵素反応で生じた界面 pH 変化が pH 応答型ポリマーにより検出されていると考察された。また、iPAPy-PIC (AChE) 電極が iPPy-PIC (AChE) 電極に比べ迅速な応答を示していることは、Fig. 2 に示すように iPAPy 膜厚 (20 nm) が iPPy 膜厚 (50 nm) に比べ薄いことが一因となっていると考えられる。

Fig. 5 は Fig. 4 をもとに作成された iPAPy-PIC (AChE) 電極, iPPy-PIC (AChE) 電極それぞれの ACh 電位応答の検量線を示している。それぞれの電極はともに ACh に対し

Fig. 4 Potential response behaviors to various concentration of ACh. (a) iPAPy-PIC(AChE) electrode, (b) iPPy-PIC(AChE) electrode.

て電位応答を示すが、iPAPy-PIC (AChE) 電極の方が iPPy-PIC (AChE) 電極よりも $10^{-6} \sim 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ の濃度範囲において直線性もよく、応答電位幅すなわち感度も優れている。このことから iPAPy 中のアミノ基が、ACh から酵素反応を経て生成した酢酸の解離を促進し、電位応答が大きくなったものと予想される。この ACh に対する応答性の違いについて、さらに iPAPy, iPPy 電極の酢酸に対する電位応答について検討を行って考察を加えた。

Fig. 6a, 6b に iPAPy 電極および iPPy 電極それぞれの HCl および CH_3COOH で NaCl 溶液の pH を変化させたときの電位-pH 直線を示す。iPPy 電極の場合は、HCl, CH_3COOH それぞれの電位-pH 直線は重なっている。一方、iPAPy 電極を用いた場合では、 CH_3COOH 調整でのプロットは HCl 調整のプロットより全体的に貴方向にシフトしている。また、 CH_3COOH における iPAPy の応答電位から HCl の検量線を用いて pH を算出したところ、ガラス電極で測定した pH より約 0.1 小さい値を示した。このことから酢酸溶液を含む場合は iPAPy 電極近傍の pH は溶液バルク pH より小さくなっていると予想される。すなわち iPAPy 膜は酢酸解離を促進し、電位を貴側へシフトさせている可能性が示唆された。これが iPAPy-PIC (AChE) が iPPy-PIC (AChE) に比べてアセチルコリンに対して良好な応答を示す原因であると考えられる。この効果は 1-アミノピロールに存在するア

Fig. 5 Calibration curves of ACh sensors based on (▲) iPAPy-PIC(AChE) and (●) iPPy-PIC(AChE).

Fig. 6 pH-potential diagrams of (a) iPAPy and (b) iPPy in NaCl solution. pH was adjusted by HCl or CH_3COOH .

ミノ基が塩基として酢酸と相互作用を行った結果、酢酸解離が促進したためであろう。

本センサは、現段階では iPAPy 膜作製をかなり精密に行わないと再現性が得られないという問題がある。重合液の pH 等を正確に制御して行えば、再現性の良い重合膜作製ができるが、この点を注意しないと再現性は劣化する。センサの安定性の検討については今後の課題である。

4 結論

iPAPy が iPPy と同様に NaHCO_3 水溶液中で 1-アミノピロールを 1.25 V vs. Ag/AgCl の電位で酸化することにより

作製されること、および pH に対し良好な電位応答を示すことを明らかにした。また、AChE を固定化した PIC 膜と pH 応答性の iPPy あるいは iPAPy を複合化することにより、ポテンシヨメトリックアセチルコリンセンサが iPAPy を用いたものの方が、 $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ の範囲で直線性が良く高感度なセンサとなることが明らかになった。これは iPAPy が AChE によるアセチルコリン分解生成物である酢酸の解離を促進したためであると考えられる。

文 献

- 1) T. Osaka, T. Fukuda, K. Ouchi, and T. Nakajima, *Denki Kagaku* (presently *Electrochemistry*), **59**, 1019 (1991).
- 2) T. Osaka, T. Momma, and H. Kanagawa, *Chem. Lett.*, **432**, 137 (1993).
- 3) T. Osaka, T. Momma, S. Komaba, H. Kanagawa, and S. Nakamura, *J. Electroanal. Chem.*, **372**, 201 (1994).
- 4) T. Nakajima, F. Matsushima, T. Fukuda, and T. Osaka, *Denki Kagaku* (presently *Electrochemistry*), **59**, 1074 (1991).
- 5) T. Osaka, T. Fukuda, H. Kanagawa, T. Momma, and S. Yamauchi, *Sensors and Actuators B*, **23**, 205 (1995).
- 6) T. Osaka, S. Komaba, M. Seyama, and K. Tanabe, *Sensors and Actuators B*, **35-36**, 463 (1996).
- 7) T. Osaka, S. Komaba, and A. Amano, *J. Electrochem. Soc.*, **145**, 406 (1998).
- 8) S. Komaba, Y. Fujino, T. Matsuda, T. Osaka, and I. Satoh, *Sensors and Actuators B*, **52**, 78 (1998).
- 9) Q. Xin and R. M. Wightman, *Anal. Chim. Acta*, **341**, 43 (1997).
- 10) A. Guerrieri, G. E. De Benedetto, F. Palmisano, and P. G. Zambonin, *Analyst*, **120**, 2731 (1995).
- 11) J.-L. Marty, K. Sode, and I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, **228**, 49 (1990).
- 12) K. Gibson and G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta*, **80**, 245 (1975).