牛血清ヘモグロビン - グルコース水溶液における グルコースセンサーの劣化効果[†]

東稔節治・中村忠久

大阪大学基礎工学部 化学工学科^{††}

緒 言

グルコースセンサー（以下、センサーと呼ぶ）は、血糖濃度の分析、食品中のグルコース濃度の分析などに利用されている。血液中でセンサーを使用する場合、酵素固定化膜（以下、酵素膜と呼ぶ）表面のゲル層形成、ヘモグロビンの閉塞現象などのため、定常時の出力が低下することが知られている。しかし、酵素膜の劣化を含めたセンサーの定常時の出力の安定性の解析はなされていない。

本研究では、センサーの定常時の出力の経時変化について、前報²⁾の反応/拡散モデルを適用し、酵素膜の劣化に及ぼす因子について検討し、その評価法を提出する。

1. 実 験

1.1 牛血清ヘモグロビン水溶液の調製

血液の模擬液としては、グルコース溶存の牛血清ヘモグロビン（以下、ヘモグロビンと呼ぶ）水溶液を用いる。ヘモグロビンは、牛から採取した血液を3~5%のNaCl水溶液で数回洗い、純水を加え、COを吹き込んで溶血させ、不純物を遠心分離により取り除いて精製した。

1.2 酵素反応速度の測定

酵素膜での反応速度定数を求めるため、ヘモグロビン水溶液中で所定時間使用した酵素膜の、回分式反応による反応速度を調べた。酵素反応速度は、本研究の実験条件の範囲、つまり $C_g = 0.8 \text{ mol/m}^3$ 以下では、前報²⁾の通り、 C_g の1次式と近似することができ、求めた反応速度定数の各時間における値をTable 1に示す。

1.3 ステップ応答法による膜内拡散係数の決定

本研究で用いたセンサーは、ガルバニ式酸素電極と、PVC膜にグルコースオキシダーゼを固定化した酵素膜を組み合わせたセンサーである。前報²⁾での回分操作の方法により、ヘモグロビン水溶液中で所定時間使用したセンサーの、酵素濃度及びグルコース濃度のステップ入力に対する応答曲線を求め、反応/拡散モデルに従い、

この応答曲線を解析し、膜内拡散係数を求めた。得た拡散係数の値をTable 1にまとめた。

1.4 センサーの定常時の出力変化

Fig. 1の装置で、定常時におけるセンサーの出力の経時変化を調べるため、pH 5.6, 310K, 酸素を空気飽和させたグルコース溶存のヘモグロビン水溶液を循環し、センサーの出力を記録した。このセンサーは、ヘモグロビンを含まないグルコース水溶液中では、300時間以上一定出力を保持し、安定であったが、ヘモグロビン水溶液中では、センサーの定常時の出力は減少した。

2. 結果と考察

ヘモグロビン水溶液中でのセンサーの定常時の出力は時間と共に徐々に減少した。この原因には、膜中へのヘモグロビンの閉塞現象と膜表面における層形成の2つが考えられる。

実験開始5分後では、ゲル層は形成されていると考えられる³⁾。ゲル層の影響を調べるために、Fig. 1の装置でヘモグロビン水溶液の流量を変えたところ、センサーの定常時の出力は変わらなかった。さらに、この時間でのヘモグロビン水溶液中でのグルコース濃度のステップ入力に対する応答曲線を測定し、グルコースの膜内拡散係数を前報²⁾の方法によって推算した。この値と、ゲル層を形成しない水溶液中で得られたグルコースの膜内拡散係数とを比較すると、両者の値はほぼ一致した。これらのことから、膜表面にゲル層が形成していても、その抵抗の影響は小さいと考えられる。従って、5分以後の出力低下の主な原因は、膜内へのヘモグロビンの閉塞現象によるものと考えられる。

2.1 拡散係数及び反応速度定数の経時変化

ヘモグロビンは、膜内に様に閉塞すると考え、膜内の含水率が時間に対し直線的に減少するものと仮定し、含水率の変化をEq. (1)で表す。

$$f_w = f_w^i (1 - \alpha \theta) \quad (1)$$

膜内拡散係数は、含水率に依存し、前報²⁾で報告した様に次式で表される。

$$D_j = D_j^0 \cdot f_w^n, \quad n = 4.5 \quad (2)$$

Eqs. (1), (2)より次式を得る。

[†] 1987年7月22日受理；化学工学協会第52年会（名古屋，1987年4月）にて発表

^{††} 〒560 豊中市待兼山町1-1

Table 1 Values of k from batch reaction and evaluated values of D_{O_2} and D_g

θ [h]	C_h [kg/m ³]	k [1/s]	$D_{O_2} \times 10^{10}$ [m ² /s]	$D_g \times 10^{11}$ [m ² /s]
0	—	0.178	3.21	9.32
10	10	0.168	2.78	8.65
20	10	0.153	2.68	7.80
30	10	0.145	2.42	7.14
40	10	0.131	2.30	7.03
150	10	0.078	1.88	5.66
10	2	0.174	3.05	9.22
25	2	0.170	2.91	8.83
40	2	0.166	2.82	8.07
150	2	0.082	2.10	6.51

$$1 - \frac{1}{f_w^i} \sqrt{\frac{D_j}{D_j^0}} = \alpha \theta \quad (3)$$

Fig. 2 に $1 - \sqrt{D_j/D_j^0}$ ($j = O_2, g$) 対 θ のプロットを示した。ヘモグロビン濃度が一定の溶液においては、40時間までは劣化係数 α は一定であり、Eq.(1) でうまく相関できた。なお、 α はヘモグロビン濃度に依存し、その値は、 $C_h = 10 \text{ kg/m}^3$ で $\alpha = 1.3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ 、 $C_h = 2 \text{ kg/m}^3$ で $\alpha = 4.8 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ であった。しかし、40時間以上では α は一定とならず、Eq.(1) では相関できなかった。これは、ヘモグロビンの膜内への閉塞現象による吸着の過程で、吸着層が厚くなると、吸着量が減少するため、細孔の断面積変化が小さくなるためと考えられ、膜材との静電的作用などの物理化学的因子を含めた解析が必要となる。

次に、膜内の酵素活性の低下は、ヘモグロビンが酵素表面上に吸着して起こると考えられるが、反応速度定数の経時変化は、次の実験式で表示されるものとする。

$$k = k' (1 - \alpha \theta)^m \quad (4)$$

Eq.(4) に従って、Table 1 に示される k の値を用いて、 $\log(k/k')$ 対 $\log(1 - \alpha \theta)$ を Fig. 3 にプロットする。これより両者に直線関係が得られた。その直線の勾配より $m = 3.5$ を得た。

2.3 センサー出力の変化を考えたモデルと実測値の比較

前報²⁾ の反応/拡散モデルにより提出した基礎式が適用できると考え、擬定常状態を仮定すると、次式を得る。

$$D_j \frac{d^2 C_j}{dx^2} = k C_g \quad (j = O_2, g) \quad (5)$$

酵素膜表面、 $x = 0$ での境界条件は次の様に課せられる。

$$C_g = C_g^i, \quad C_{O_2} = C_{O_2}^i \quad (6)$$

酵素膜と酸素電極の境界面、 $x = L$ での境界条件は次の様に課せられる。

$$-dC_g/dx = 0, \quad -dC_{O_2}/dx = h' C_{O_2} \quad (7)$$

ここで、 h' はみかけの物質移動係数で、 $h' = 0.3 \text{ m}^{-1}$ で

Fig. 1 Experimental apparatus ① Recorder ② Glucose sensor ③ Thermometer ④ Flow meter ⑤ Air pump ⑥ Stirrer ⑦ pump ⑧ Coolnics ⑨ Reservoir of Hb solution ⑩ secondary tank

Fig. 2 Effect of plugging on D_j ($j = O_2, g$)

あった²⁾。

Eq.(5) を Eqs.(6), (7) の下で積分すると、 $x = L$ での酸素濃度 C_{O_2} は次式で表せる。

$$C_{O_2} = C_{O_2}^i + \left(1 - \frac{h' L}{1 - h' L}\right) \cdot \frac{F}{w^2} \{2 \exp(-wL) - 1 - \exp(-2wL)\} \quad (8)$$

Fig. 3 Effect of plugging on k

ただし,

$$F = \frac{kC_g^i}{D_{O_2}\{1+\exp(-2wL)\}}, \quad w = \sqrt{k/D_g} \quad (9)$$

Eq.(8)に D_{O_2} , k を用いて C_{O_2} を計算した。また、センサーの定常時の出力が酸素濃度に比例することより酸素濃度を電圧変化として換算できる。Fig. 4にセンサーの定常時の出力の使用時間による変化を、Eq.(8)による計算値と共に示した。40時間までは計算値と測定値の一致は良好である。しかし、50時間経過したところから両者の差が大きくなる。これは、Eqs.(2),(4)の相関が適用できないことにあり、閉塞現象を D_j ($j=O_2, g$)と k の経時変化についての関係式を今後、検討する余地があると考えられる。

Nomenclature

C	= solute concentration in aqueous solution	[mol/m³],[kg/m³]
D	= diffusion coefficient	[m²/s]
E	= output of the sensor	[V]
f_w	= fractional water content of PVC membrane	[-]
G	= transfer function	[-]
h'	= apparent mass transfer coefficient	[1/s]
k	= reaction rate constant	[1/s]

Fig. 4 Variation of output of the glucose sensor with time

L	= membrane thickness	[μm]
m	= exponent on $(1-\alpha\theta)$ in Eq.(4)	[-]
n	= exponent of f_w in Eq.(2)	[-]
T	= temperature of solution	[K]
x	= axial coordinate in membrane	[m]

α	= proportional constant in Eq.(1)	[-]
θ	= process time	[h]

<Subscripts>

g	= glucose
h	= hemoglobin
O_2	= oxygen

<Superscripts>

i	= initial value
$^\circ$	= free solution

Literature cited

- 1) Howell, J.A. and O. Velicangil: "Polymer Science and Technology Vol.13", p.217, plenum press, New York and London (1981)
- 2) Tone, S., K. Yamamoto and T. Nakamura: Preprints of the 52nd Annual Meeting of the Soc. of Chem. Engrs., Japan, p.334, Nagoya (1987)
- 3) Tone, S., M. Yamamoto and T. Otake: Preprints of the Fukuoka Meeting of the Soc. of Chem. Engrs., Japan, p.81, Fukuoka (1983)

Aging Effect of a Glucose Sensor Immersed in Aqueous Glucose-Bovine Serum Hemoglobin Solutions

Setsuji Tone and Tadahisa Nakamura

Dept. of Chem. Eng., Osaka Univ., Toyonaka 560

Key Words : Biochemical Engineering, Glucose Sensor, Bovine Serum Hemoglobin, Oxygen Electrode, Enzyme Membrane, Plugging Phenomena, Reaction Diffusion Model, Membrane Deactivation

A glucose sensor consisting of an enzyme membrane and an oxygen electrode was used to measure the glucose concentration in aqueous bovine serum hemoglobin solution. The enzyme membrane was an immobilized glucoxidase-PVC membrane having a finely porous structure.

During application of the sensor to the solutions, bovine serum hemoglobin adsorbs on the surface of pores of the PVC membrane. Owing to the plugging of hemoglobin within the membrane, the steady-state output falls with time.

Based on the reaction-diffusion model for the enzymatic reaction in the membrane, the diffusion coefficients and the reaction rate constant were evaluated. These parameters were successfully correlated with time. Calculated values of declining output of the sensor at steady state with time agreed well with the observed ones.

相間移動触媒としてのポリエチレングリコールの触媒活性 に対するメタノール添加の影響[†]

井土忠厚・斎木基久・後藤繁雄

名古屋大学工学部 化学工学科^{††}

ポリエチレングリコール（以下PEGと記す）は相間移動触媒として市販されており、クラウンエーテル等の他の相間移動触媒にくらべ安価で入手しやすい。

既報¹⁾でトルエン中の2-プロモオクタン（有機相）の水酸化カリウム水溶液（水相）による脱ハロゲン化水素をトリオクチルメチルアンモニウムクロライド(TOMAC)を相間移動触媒として行った。その結果、反応速度と触媒の塩基性には相関関係があること、有機相中の触媒は強い塩基性を示すが、条件によってはその量は時間とともに減少し、メタノールを加えるとこの減少を止めることができる等の結果をえた。

本研究では同じ反応をPEGを触媒として行い、メタノール添加の影響を調べた。

実験方法

触媒には、平均分子量200,400,1000,3000および20000のPEG（和光純薬：1級）を使った。

実験装置、方法および試薬は既報¹⁾と同じである。

反応 水酸化カリウムの飽和溶液である水相と、トルエン（またはメタノールを加える実験の場合にはトルエンとメタノール）に触媒および反応物を予め混合した有機相をそれぞれ50℃に保ち、両者を回分式反応器中で混ぜ合わせるにより反応を開始した。これは既報¹⁾の実験方法Aに相当する。なお、既報¹⁾では実験方法Bすなわち、先の水相と触媒のみを含む有機相を予め2時間混合し、ここに反応物を加えて反応を開始する方法で

[†] 1987年7月31日受理

^{††} 〒464 名古屋市千種区不老町