プロトン導電性厚膜を用いた起電力および 電流検出方式グルコースセンサー

(1992 年 3 月 21 日 受理)

又吉直子・三浦則雄・山添 昇*

プロトン導電性固体電解質であるアンチモン酸の厚膜を使った素子をトランスデューサー部に用いることにより、全固体型でしかも外部参照極を必要としない新しいタイプのグルコースセンサーを試作した。本センサーでは起電力および電流を応答信号として取り出す二つのタイプが可能である。

アンチモン酸厚膜はアルミナ基板上にスピコーティング法により作製し、この厚膜上に Pt 検知極, Au 対極, さらに Ag 内部参照極を取り付けた。酵素は、検知極上にグルコースオキシダーゼ (GOD) と撥水性のカーボンペーストを混合したものを薄く塗布することにより固定化した。

起電力検出方式では、素子起電力とグルコース濃度の対数との間に $5 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-2}$ M の範囲で Nernst 式に従う良好な直線性が得られた。90% 応答時間は 1 分程度であり、感度は約 10 日間ほぼ一定した値をとった。また、内部参照極を取り付けた素子を用いた電流検出方式では、電流値とグルコース濃度とは $0 \sim 7 \times 10^{-3}$ M の範囲において直線性を示した。さらに内部参照極や外部印加電源を用いずに、Pt 検知極と Au 対極間を短絡した状態で作動させる短絡電流検出方式では、電流応答は $0 \sim 4 \times 10^{-3}$ M のグルコース濃度に対して直線性を示した。また、この濃度依存性は GOD 固定化後、11 日間は変化しなかった。

本センサーのグルコースに対する応答は、いずれの検出方式でも GOD による酵素反応で生じた H_2O_2 を介するものであることがわかった。

1 緒 言

バイオセンサーは、信号受容部 (レセプター) である生体関連物質と信号変換部であるトランスデューサーから構成されるため、この二つの組合せを変えることにより多種多様な素子が得られる。トランスデューサーへの生体関連物質の固定化法については、従来からの共有結合法、橋かけ法、包括法などのほかに、最近では電界重合法、フォトリソ法、LB 膜法などの様々な方法も提案されている。一方、トランスデューサー部についてはセンサー素子全体の小型化、集積化を目指して、従来の電解質溶液を用いた電気化学式酸素電極やイオン選択性電極などに代わって、Pt 線^{1)~5)}、Ti 線⁶⁾、マイクロ金電極⁷⁾⁸⁾、炭素電極⁹⁾、さらにはイオン感応性電界効果型トランジスター (ISFET)^{10)~12)} など

を用いるものも報告されている。ただし、これらもほとんどが外部参照極を必要としている。

ところで、著者らはこれまで、溶存酸素や過酸化水素を常温で検知できる LaF_3 単結晶 (フッ化物イオン導電性固体電解質) 素子¹³⁾¹⁴⁾ をトランスデューサーとして用いることにより、外部参照極や外部電圧印加が不要な全固体型の新しいタイプの酵素センサ

- 九州大学大学院総合理工学研究科 材料開発工学専攻, 816 春日市春日公園 6-1
- 1) Y. Ikariyama, S. Yamauchi, M. Aizawa, T. Yukiashi, H. Ushioda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 525(1988).
 - 2) Y. Ikariyama, S. Yamauchi, T. Yukiashi, H. Ushioda, *J. Electrochem. Soc.*, **136**, 702(1989).
 - 3) S. Yamauchi, M. Yaoita, R. Nagai, Y. Yoshida, Y. Ikariyama, *Denki Kagaku*, **58**, 1103(1990).
 - 4) S. K. Beh, G. J. Moody, J. D. R. Thomas, *Analyst*, **114**, 29(1989).
 - 5) H. M. Abdulla, G. M. Greenway, A. E. Platt, P. R. Fielden, *ibid.*, **114**, 785(1989).

- 6) 池田章一郎, 木村正美, 野田英智, 伊藤 要, 大倉國利, 中尾昭公, 高木 弘, 近藤達平, 電化, **56**, 1055(1988).
- 7) E. Tamiya, I. Karube, S. Hattori, M. Suzuki, K. Yokoyama, *Sensors & Actuators*, **18**, 297(1989).
- 8) P. D. T. D. Poet, S. Miyamoto, T. Murakami, J. Kimura, I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, **235**, 255(1990).
- 9) J. Wang, L. Wu, Z. Lu, R. Li, J. Sanchez, *Anal. Chim. Acta*, **228**, 251(1990).
- 10) M. Gotoh, E. Tamiya, A. Seki, I. Shimizu, I. Karube, *Anal. Lett.*, **22**, 309(1989).
- 11) R. Hintsche, G. Neumann, I. Dransfeld, G. Kampfeath, B. Hoffmann, F. Scheller, *ibid.*, **22**, 2175(1989).
- 12) F. Gardies, N. J. Renault, C. Martelet, H. Perrot, S. Aleglet, J. M. Valleton, *Anal. Chim. Acta*, **231**, 305(1990).
- 13) 桑田茂樹, 三浦則雄, 山添 昇, 清山哲郎, 日化, 1984, 1232.
- 14) N. Yamazoe, J. Hisamoto, N. Miura, S. Kuwata, *Sensors & Actuators*, **12**, 415(1987).

ーを報告している¹⁵⁾¹⁶⁾。LaF₃は常温でも比較的良好なイオン導電性を有する固体電解質であるが、このような機能を有する材料としてはアンチモン酸などのプロトン導電体も考えられる。著者らは、プロトン導電体をセンサー材料として用いれば、常温動作が可能な種々のガスセンサーが得られることをすでに報告している^{17)~20)}。したがって、これらのプロトン導電体素子もバイオセンサーのトランスデューサー部に使用できると考えられる。さらに、アンチモン酸を用いた場合には良好な厚膜素子¹⁹⁾²⁰⁾の作製が可能であるため、LaF₃単結晶を用いた素子と比べて、より一層の小型化、集積化を図ることができる。

そこで本研究では、このプロトン導電体(アンチモン酸)厚膜を用いた素子をトランスデューサー部とし、これにグルコースオキシダーゼを固定化することにより全固体型のグルコースセンサーを試作し、まず起電力検出方式による応答特性や応答機構について検討²¹⁾を加えた。さらに、アンチモン酸は常温でも比較的高いイオン導電性を有しているので、電流を応答信号として取り出すことも十分可能と思われる。そのため、起電力検出型素子に内部参照極を取り付け、外部電圧を印加した時の電解電流応答について調べるとともに、検知極と対極を短絡させた状態での電流値を測定する新しい短絡電流検出方式についても検討²²⁾を加えた。

2 実験方法

2.1 センサー素子

厚膜作製用ペーストは、アンチモン酸粉末(Sb₂O₅・2H₂O、東亜合成化学工業より提供)にバインダーとしてのポリスチレン(30 wt%)と溶媒としてのトルエンを加えたものを、マグネチックスターラーで十分に混練することにより調製した。このペーストを15 mm角、厚さ2 mmの多孔質アルミナ基板(見かけ気孔率:30%)の片面にスピニング法(回転数:3100 rpm)により塗布し、室温乾燥させてアンチモン酸厚膜を得た¹⁹⁾。

図1には、このアンチモン酸厚膜素子を用いたグルコースセンサーの構造を模式的に示した。(a)はアルミナ基板上に作製した厚膜上に検知極としてPtを、対極としてAuをRFスパッタリング法によって取り付けた起電力検出用および短絡電流検出用の素子である。(b)の電解電流検出用素子には、さらに内部参照極としてAgをRFスパッタリング法によって取り付けて3電極としている。また、検知極以外は外部雰囲気による影響を抑えらるとともに素子の安定性を保つために、撥水性コーティング剤で被覆した。酵素の固定化は、検知極表面に、グルコースオキシダ

Fig. 1 Structure of two types of glucose sensor based on the proton-conductor thick-film

(a): Two-electrode type for potentiometry (emf) and amperometry (shortcircuit current)

(b): Three-electrode type for amperometry (electrolytic current)

ーゼ(GOD, 150 U/mg, SIGMA)約0.7 mgと撥水性のカーボンペースト約10 μ lを混合したものを薄く塗布することにより行った。

図2には、上記で作製したグルコースセンサー素子の表面及び断面の走査型電子顕微鏡(SEM, 日立, S-510)写真を示す。これよりアンチモン酸厚膜の厚さは10~20 μ mであり、かなり緻密であることがわかる。またGODを混合したカーボンペーストの

Fig. 2 SEM photograph of a cross-section of the sensor element

- 15) N. Matayoshi, N. Miura, N. Yamazoe, *Solid State Ionics*, **40/41**, 440(1990).
- 16) 又吉直子, 三浦則雄, 山添 昇, *分析化学*, **39**, 741(1990).
- 17) N. Miura, K. Kanamaru, Y. Shimizu, N. Yamazoe, *Chem. Lett.*, **1989**, 1103.
- 18) N. Miura, T. Harada, N. Yamazoe, *J. Electrochem. Soc.*, **136**, 1215(1989).
- 19) 三浦則雄, 吉田宣明, 又吉直子, 清水陽一, 桑田茂樹, 山添 昇, *セラミックス論文誌*, **97**, 1300(1989).
- 20) N. Miura, T. Harada, Y. Shimizu, N. Yamazoe, *Sensors & Actuators*, **B1**, 125(1990).
- 21) N. Matayoshi, N. Miura, N. Yamazoe, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **30**, 1594(1991).
- 22) 又吉直子, 三浦則雄, 山添 昇, 第13回化学センサ研究発表会予稿集, p.37 (1991).

厚さは約 120 μm であり、その表面は 0.2 μm 程度のカーボン粒子が凝集したかなりポーラスな状態であり、GOD の固定化に適していることがわかった。

2.2 センサー特性測定

作製した素子の溶存酸素、 H_2O_2 、グルコースに対する応答特性は、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.9) 中に素子を浸し、マグネチックスターラーでかきまぜながら 30 $^{\circ}\text{C}$ において調べた。起電力検出方式では、応答信号として Pt 検知極と Au 対極との電位差をエレクトロメーター (ADVANTEST, TR-8652) により測定した。また、電流検出方式においては、電流-電圧特性はポテンシオスタット (北斗電工, HA-301) とファンクションジェネレーター (北斗電工, HB-105) を用いて測定した。さらに、短絡電流検出方式では、Pt 検知極と Au 対極とを短絡したときの電流値をゼロシャントアンメーター (北斗電工, HM-104) を用いて測定した。

3 起電力検出方式グルコースセンサー

3.1 厚膜素子の基本特性

まず、図 1 (a) に示したタイプの素子について、 H_2O_2 濃度を变化させた時の Pt 検知極および Au 参照極の Ag/AgCl 外部参照極に対する各電位応答を調べた。図 3 に示すように、Pt 検知極の電位は H_2O_2 を注入することにより大きな応答を示すのに対して、コーティング剤で表面を被覆した Au 参照極では、 H_2O_2 濃度が変化しても電位応答はほとんど見られなかった。したがって、この被覆 Au 参照極は H_2O_2 に対して不活性な一種の内部参照極として使えるため、素子の応答信号としては Pt-Au 両電極間の電位差 (起電力) を測定すれば良いことがわかった。

ところで、本研究で用いたアンチモン酸厚膜はプロトン導電性を有すると同時に、イオン交換性も有することが知られている²³⁾。そのため、本厚膜素子をリン酸塩緩衝液中に浸漬して使用する場合には、緩衝液中の Na^+ イオンとアンチモン酸厚膜中のプロトン (H^+) とのイオン交換により、電極界面近傍での厚膜中のプロトン濃度が変化し、素子の安定性を低下させるおそれがある。実際、素子をリン酸塩緩衝液中に浸しておき、溶存 H_2O_2 に対する応答を調べたところ、図 4 (a) に示すように Pt 検知極を溶存 H_2O_2 と直接接触させた場合には、測定ごとに素子の起電力値および応答感度に低下が見られた。これに対して、検知極上に疎水性のカーボンペーストを塗布した場合には、図 4 (b) に示すように測定を行った 5 日間は応答特性の経時変化はほとんど見られなかった。したがって、このような疎水性のカーボンペーストの塗布は、酵素の固定化のためだけでなく、リン酸塩緩衝液中での素子の安定性向上にも重要な意味をもつことがわかった。

3.2 溶存酸素および H_2O_2 に対する応答特性

Pt 検知極にカーボンペーストだけを塗布した素子 (酵素未固定) について、リン酸塩緩衝液中の溶存酸素に対する応答特性を調べた。その結果、図 5 に示すように素子起電力と溶存酸素濃度の対数との間には、3~30 ppm の範囲において Nernst 式に従う良好な相関が得られた。このときの起電力値は、酸素濃度の増加とともに増加する傾向を示した。その直線の勾配は約 17 mV/decade であり、これより溶存酸素 1 分子当たりの反応電子数 (n)

Fig. 3 Response transients of the electrode potentials (vs. Ag/AgCl) on injection of H_2O_2
(a): Pt electrode, (b): Au electrode

Fig. 4 Influence of the carbon-paste coating on the stability of the emf responses to H_2O_2
(a): Without carbon-paste coating, (b): with carbon-paste coating

は約 3.6 と計算される。したがって、本素子の検知極上では (1) 式のような酸素の 4 電子還元反応が起こっていると考えられる。

また本素子は上述したように溶存 H_2O_2 にも応答し、図 6 (a) に示すように素子の起電力と H_2O_2 濃度の対数との間には、1×

Fig. 5 Emf response to dissolved oxygen in the buffer solution

 Fig. 6 Emf response to (a) H_2O_2 and (b) glucose in the buffer solution

$10^{-4} \sim 2 \times 10^{-2}$ M の範囲で直線性が得られた。ただし、その時の起電力値は H_2O_2 濃度の増加にともない減少する傾向を示し、溶存酸素に対する挙動とは逆であった。また、この場合の Nernst 勾配は約 -55 mV/decade と溶存酸素の場合よりもかなり大きく、 H_2O_2 1 分子に対する反応電子数は約 1.0 と求められる。これより、Pt 検知極上では以前に報告した LaF_3 素子の場合と同様に、(2) 式に示すような H_2O_2 の 1 電子酸化反応が起こっていると考えられる。

3.3 グルコースに対する応答特性

次に、GOD を混合したカーボンペーストを検知極上に塗布して酵素を固定化した素子を用いて、グルコースの検知特性を調べた。その結果、図 6 (b) に示すように、起電力とグルコース濃度の対数との間に $5 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-2}$ M の範囲で良好な直線性が得られた。その直線の傾きは約 -54 mV/decade であり、上述の H_2O_2 に対する場合の勾配に近い。また、応答性が得られる濃度範囲は両者とも比較的近く、しかも起電力の変化方向も同一である。一方、前述の溶存酸素に対する応答と比べると Nernst 勾配の向きが逆で、その値も大きく異なっている。したがって、本素子のグルコースに対する応答は、GOD 存在下でのグルコースの酸化反応 (3) により消費される O_2 ではなく、生成する H_2O_2 への応答によって得られると考えられる。この応答特性は LaF_3 グルコースセンサーで提案¹⁵⁾¹⁶⁾したものと同じである。

本素子のグルコースに対する 90% 応答時間は 1 分程度であ

Fig. 7 Long-term stability of the emf response to glucose (glucose sensitivity)

Glucose concentration: 3×10^{-2} M

り、これは H_2O_2 に対する応答速度と同程度である。また、本素子のグルコース感度については、図 7 に示すように、GOD 固定化後 10 日間は安定した値をとったが、その後は徐々に低下した。 H_2O_2 感度については素子作製後 14 日目でも変化がほとんどなかったため、グルコース素子の 10 日目以降の感度の低下は、素子に固定化された酵素の活性低下に起因していると考えられる。この場合酵素の固定化は、GOD とカーボンペーストの混合塗布という単純な方法で行っているため、感度低下は酵素の溶液中への溶出が主な原因と思われる。したがって、感度の安定性の改善のためには、より優れた酵素の固定化法を検討する必要がある。

4 電流検出方式グルコースセンサー

4.1 外部参照極を用いた電解電流応答

アンチモン酸は常温でも $10^{-4} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$ 程度のイオン導電率を示すため、応答信号として電流値を取り出すことも可能と思われる。そこでまず、このアンチモン酸厚膜素子において、電解電流検出方式としての作動が可能かどうかを、外部参照極を用いた一般的な 3 電極方式の測定により調べた。ここで用いたアンチモン酸厚膜素子は、起電力検出方式の場合と同様に Pt 検知極上に GOD をカーボンペーストで固定化し、Au 対極は撥水性膜でコーティングすることにより作製した。外部参照極には市販の飽和甘こう電極 (SCE) を使い、試料溶液中でポテンシオスタットにより参照極に対する検知極の電位 (E) を変化させながら、検知極-対極間に流れる電流値 (I) を測定した。

図 8 には、検知極電位を 30 mV/s の速度で走査した時の種々の濃度のグルコース溶液中での I - E 特性を示した。各濃度のグ

 Fig. 8 Electrolytic current (I) vs. Pt electrode potential (E) in glucose solutions of (a) 50 mM, (b) 10 mM and (c) 0 mM

Two-electrode type element

Fig. 9 Increments of electrolytic current (ΔI) as correlated with glucose concentrations

Two-electrode type element, Pt electrode potential: 0.7 V vs. SCE

ルコース溶液に対して、あまり明確ではないが 0.65 V 付近より限界電流と見られる領域が観察される。そこで、検知極の電位を SCE に対して 0.7 V に設定し、種々のグルコース濃度に対する電流応答 (ΔI : 緩衝液中での電流値からの変化幅) を測定した。その結果、図 9 に示すように ΔI はグルコース濃度が 0~ 10^{-2} M の範囲で直線的に変化することがわかった。このことは、本素子を電流検出方式として作動させることも可能なことを示している。

4.2 内部参照極をもつ素子の電解電流応答

次に、外部参照極を用いずに、図 1 (b) のように Ag を内部参照極として取り付けたセンサー素子について検討した。図 1 (a) の素子では表面を被覆した Au 対極が H_2O_2 に対してはほぼ不活性な電極であることを示したが、ここでは表面を被覆した Ag 極も安定な参照極として作動するかどうかについて調べた。そのために、種々の濃度の H_2O_2 溶液中での Ag/AgCl 外部参照極に対する電位差を測定したところ、図 10 に示すように、測定した 10^{-5} ~ 10^{-2} M の広い濃度範囲で電位変化はまったくみられないことがわかった。したがって、この Ag 極は H_2O_2 に対して不活性であり、安定な内部参照極として使えそうである。

本素子を試料溶液中に浸し、ポテンシオスタットにより内部参照極を基準として検知極に電位を印加 (走査速度: 10 mV/s) しながら、Pt 検知極-Au 対極間に流れる電流値を測定した。図 11 には、緩衝液中に純酸素を約 60 cm³/min の流速で 2 時間導入した場合、またはスターラーによるかきまぜで空気を十分に導入した場合の I - E 特性を示している。両者の溶存酸素濃度は明らかに異なると思われるが、 I - E 特性にほとんど差は認められないため、この印加電圧領域では溶存酸素に対する電流感度は非常に小さいと思われる。図 12 には緩衝液およびグルコース溶液中での I - E 特性を示したが、明確な限界電流は見られないものの、約 0.4 V 以上ではグルコース濃度が増加するにしたがって酸化電流の比較的大きな増加が見られた。同様な測定を H_2O_2 に対して行った場合にもほぼ同様な挙動が見られた。したがって、グルコースに対する酸化電流の増加は、検知極上に固定化された GOD による酵素反応 (3) 式で生成した H_2O_2 が、この印加電圧では (4) 式の電気化学的な酸化反応を起こすことに起因しているためであると考えられる。ここで生成した H^+ はアンチモン酸厚膜中を移動し、対極において水を生成する (5) 式の電気化学的還

Fig. 10 Ag electrode potentials (vs. Ag/AgCl) in the buffer solutions of varying concentrations of H_2O_2

Three-electrode type element

Fig. 11 I - E characteristics in the buffer solutions equilibrated with (a) pure O_2 and (b) air

Three-electrode type element

Fig. 12 I - E characteristics in glucose solutions of (a) 0 M, (b) 10^{-5} M, (c) 10^{-4} M, (d) 5×10^{-4} M

Three-electrode type element

元反応を起こす。この時、外部回路を流れる電流が応答電流として取り出されるものと思われる。

上述の I - E 特性の結果を考慮して、検知極の電位を Ag 参照極に対して 0.7 V に設定することにより、本素子の H_2O_2 およびグルコースに対する電流応答 (ΔI) を調べた。図 13 にそれぞれ

Fig. 13 Increments of electrolytic current (ΔI) as correlated with the concentrations of H_2O_2 (a) and glucose (b) in the buffer solution

Three-electrode type element, Pt electrode potential: 0.7 V vs. Ag

の濃度依存性を示すが、 H_2O_2 に対しては $0 \sim 2 \times 10^{-3}$ M、グルコースに対しては $0 \sim 7 \times 10^{-3}$ M の範囲において良好な直線性が観察された。グルコースの応答は酵素反応により生成した H_2O_2 に起因するとしたが、この図では両者の応答電流値並びに直線性が見られる濃度範囲に明らかに違いが見られる。これは H_2O_2 の検知の場合には溶液中から拡散してくる H_2O_2 を直接検知するのに対して、グルコース検知では酵素反応により生じた H_2O_2 により間接的にグルコースが検知されるために、このような差が生じたものと考えられる。

図 14 には種々の濃度の H_2O_2 およびグルコース溶液を注入した時の応答曲線を示した。90% 応答時間は H_2O_2 の場合では約 30 秒程度であるのに対して、グルコースの場合には約 2 分程度であった。この応答速度の違いは、カーボンペースト膜を通る両者の拡散速度の差、またはグルコースから GOD により H_2O_2 が生成する時の速度、すなわち酵素反応速度が遅いことに起因していると考えられる。

以上のように、内部参照極を取り付けたアンチモン酸厚膜素子をトランスデューサーに用いることにより、小型で外部参照極が不要な電流検出方式のグルコースセンサーが得られることがわか

Fig. 14 Response transients of electrolytic current on injection of H_2O_2 (a) and glucose (b)

Three-electrode type element, Pt electrode potential: 0.7 V vs. Ag

Fig. 15 Short-circuit current (I_s) as correlated with the concentrations of dissolved oxygen in the buffer solution

Two-electrode type element

った。

4.3 短絡電流方式による応答特性

外部および内部参照極を用いることなく、図 1 (a) に示した起電力検出型素子の Pt 検知極と Au 対極を短絡させた状態で作動させても、グルコースの検知が可能であることを見いだした。この場合、電圧印加用外部電源はまったく不要である。図 15 には、Pt 検知極にカーボンペーストを塗布した素子 (GOD 未固定) を用いて、短絡電流値 (I_s) の溶存酸素濃度依存性を調べた結果を示した。溶存酸素濃度 $0 \sim 37$ ppm の間で直線性が見られるが、電流の変化幅は測定した濃度範囲で約 12 nA 程度と小さかった。図 16 には短絡電流の変化値 ΔI_s の H_2O_2 濃度依存性を示した。 $0 \sim 5 \times 10^{-5}$ M の濃度範囲ではほぼ直線性が見られるが、それ以上の濃度では ΔI_s はやや頭打ちになる傾向が見られた。図 17 には、検知極上に GOD を固定化した素子に対する ΔI_s のグルコース濃度依存性を示した。高濃度側では ΔI_s はやはり飽和する傾向が見られるが、低濃度側では約 4×10^{-3} M まで直線性が見られた。このグルコースに対する応答特性は、図 15 の溶存酸素に対する特性とはまったく異なるが、 H_2O_2 に対する特性とはかなり似かよっている。したがって、本短絡電流検知方式においてもこれまでのタイプの素子と同様に、酵素反応によって生成し

Fig. 16 Increments of the short-circuit current (ΔI_s) due to H_2O_2 as correlated with the concentration of H_2O_2 in the buffer solution

Two-electrode type element, in ambient air

Fig. 17 Increments of the short-circuit current (ΔI_s) due to glucose as correlated with the concentration of glucose in the buffer solution on the 4th and the 11th day after sensor fabrication

Two-electrode type element, in ambient air

た H_2O_2 に対する応答によりグルコースが検知されていると考えられる。また、電極反応についても検知極側では前述の反応(4)を、対極では反応(5)を考えることができよう。しかしながら、図 16 と図 17 を比べると、グルコースに対する応答の見られる濃度範囲が H_2O_2 の場合に比べて約 2 桁大きくなっている。これはグルコースがカーボンペースト膜中を通して GOD に到達する時の拡散速度が小さいこと、酵素反応自体の速度が小さいこと、さらに生成する H_2O_2 の Pt 検知極への拡散速度が小さいことなどに起因していると考えられる。

本素子のグルコースに対する ΔI_s の濃度依存性は、図 17 に示すように GOD を固定化して 11 日目まではほとんど変化はなく、この期間内では応答感度は安定しているといえる。ただし、電流値の絶対値については、時間が経つにつれて減少する傾向が見られた。また、11 日目以降ではグルコースに対する感度が急激に低下するとともに、 H_2O_2 に対する感度も素子作製後 15 日目には低下することがわかった。前述した起電力検出方式の素子の場合にも、グルコース感度の長期安定性は約 10 日であったことを考慮すると、11 日目以降の感度の低下は固定化した GOD 活性の低下に加え、プロトン導電体自体がイオン交換などによって劣化していることも原因になっていると考えられる。

このように、短絡電流検出方式素子では応答の再現性や経時安

定性などにまだ問題を残しているが、外部印加電源および参照極がまったく不要という特徴を有しており、しかも起電力検出方式とは異なり、グルコース濃度の変化が小さい場合にも測定が可能であるため、より簡易型のセンサー素子が得られる可能性がある。

5 結 論

プロトン導電性固体電解質であるアンチモン酸を用いた厚膜素子をトランスデューサーとしたグルコースセンサーを作製し、次の知見を得た。

(1) Au, Ag 極は撥水性のコーティング剤で表面を被覆することにより、 H_2O_2 に対して不活性な電極として使えることがわかった。また、緩衝液中での素子の安定性を保つためには、検知極以外は撥水性のコーティング剤で被覆し、検知極は撥水性のカーボンペーストを塗布すれば、かなり効果があることがわかった。

(2) 起電力検出方式の素子では、溶存酸素、 H_2O_2 、およびグルコースに対してそれぞれ Nernst 式に従う応答を示した。グルコースに対しては、起電力と濃度の対数とは $5 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-2}$ M の範囲で良好な直線性が得られた。90% 応答時間は約 1 分であり、グルコースに対する感度は約 10 日間安定していた。また、本センサーのグルコースに対する応答は、酵素反応で生じた H_2O_2 の検知によって起こると思われる。

(3) 内部参照極を取り付けた素子を用いた時の電解電流検出方式でも、 H_2O_2 やグルコースを検知できることがわかった。 $+0.7$ V (vs. Ag) に検知極電位を設定した時、電解電流値のグルコース濃度に対する濃度依存性は、 $0 \sim 7 \times 10^{-3}$ M の濃度範囲において直線性を示した。

(4) 内部参照極や外部印加電源を用いない短絡電流検出方式でも、グルコースの検知が可能であることがわかった。この時の短絡電流応答は、グルコース濃度が $0 \sim 4 \times 10^{-3}$ M の範囲で直線性を示した。

以上のように、アンチモン酸厚膜をトランスデューサー材料として用いれば、小型で外部参照極が不要な全固体型グルコースセンサーが得られることがわかった。本素子では、起電力検出および電流検出の両方式での測定が同一素子で可能であり、アンチモン酸厚膜上に複数の検知極を取り付け、種々の酵素を固定化した集積型センサー素子の作製も可能と思われる。

なお、本研究の一部は武田科学振興財団研究助成金によった。ここに記して謝意を表する。

Potentiometric and Amperometric Glucose Sensor Using Proton-Conductive Thick-Film

Naoko MATAYOSHI, Norio MIURA and Noboru YAMAZOE*

Department of Materials Science and Technology, Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University; Kasuga-shi 816 Japan

New solid-state enzyme sensors capable of potentiometric or amperometric detection of glucose were explored based on the proton-conductive thick-film of antimoninic acid spin coated on a porous alumina substrate. Two types of planar sensor element were fabricated by depositing the sensing electrode (Pt), counter electrode (Au) and/or reference electrode (Ag) on top of the proton-conductive film by RF sputtering (Figs.1 and 2). Glucose oxidase (GOD) was applied on the Pt electrode together with a carbon paste which not only immobilized GOD but also protected the proton-conductive film from deterioration in the phosphate buffer solution (Fig.4), while the remaining surface was covered with a water-proof coating layer. The two-electrode type element attached with a pair of sensing and counter electrodes worked as a potentiometric sensor which varied emf logarithmically with a change in the concentration of dissolved O_2 , H_2O_2 , and glucose ($5 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-2}$ M) in the phosphate buffer solution (Figs.5 and 6). The Nernst's slope (-54 mV/decade) for glucose coincided perfectly with that for H_2O_2 , indicating that the response to glucose is generated through its enzymatic reaction product, H_2O_2 . The sensitivity to glucose was fairly stable for 10 days (Fig.7). The same element could be used as an amperometric sensor when the sensing Pt electrode was polarized vs. an external Saturated Calomel Electrode (SCE) (Fig.8), and the electrolytic current at the fixed polarization of 0.7 V (vs. SCE) was well correlated with the glucose concentration (Fig.9). This finding facilitated the design of three-electrode type element by incorporating an internal reference Ag electrode which was inactive to H_2O_2 (Fig.10). The electrolytic current of this element increased as the Pt electrode was polarized vs. the Ag electrode (Figs.11 and 12), and the amperometric response at the polarization of 0.7 V was linear to the concentrations of H_2O_2 and glucose ($0 \sim 7 \times 10^{-3}$ M) (Fig.13), with the rather rapid response rates (Fig.14). It was further shown that the short-circuit current of the two-electrode type element could also be utilized for the amperometric detection of dissolved O_2 , H_2O_2 , and glucose ($0 \sim 4 \times 10^{-3}$ M) in the buffer solution (Figs.15,16, and 17).