

報 文

オスミウム錯体を用いるポリマー修飾グルコースセンサーの試作
とその電気化学的特性評価本仲 純子^{®*}, 藪谷 智規^{*}, 丸山 健一^{*}, 塩見 得朗^{*},
立石 典生^{*}, 三島 有^{二**}Preparation and properties of a glucose biosensor based on an osmium-complex
modified polypyrroleJunko MOTONAKA, Tomoki YABUTANI, Kenichi MARUYAMA, Tokuo SHIOMI,
Norio TATEISHI^{*} and Yuji MISHIMA^{**}^{*}Department of Chemical Science and Technology, Faculty of Engineering, The University of Tokushima, 2-1, Minamijosanjima, Tokushima 770-8506^{**}Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima, 1-78, Shomachi, Tokushima 770-8505

(Received 16 July 2002, Accepted 23 October 2002)

A novel glucose sensor base on an osmium-complex modified polypyrrole was prepared and evaluated. Four new-type osmium-complexes ($[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{py}(4)\text{-bpy})]^{2+/3+}$, $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{py}(3)\text{-bpy})]^{2+/3+}$, $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{pyro-pri})\text{Cl}]^{+/2+}$, and $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{vi-bpy})]^{2+/3+}$) were synthesized, and the kinetic parameters analyzed. A hydrophilic redox polymer with an osmium-complex was modified by electrolytic copolymerization on the surface of a platinum electrode. The effects of the polymer concentration, times of the scan, dissolved oxygen, and concomitant compounds, and a calibration curve for measurements of glucose were analyzed. The catalytic currents of synthesized osmium-complexes were observed. The relationship between glucose and the oxidation current was examined using the sensor under the optimum conditions. A linear relationship was obtained over the range of 0.9–100 mmol dm⁻³ glucose. It was measured in the presence of ascorbic acid or uric acid. These compounds did not affect the response current. The lifetime of the sensor was also examined. The analytical values were constant for 9 days when the sensor was stored in a pH 7.07 phosphate buffer solution at 4°C.

Keywords : osmium redox polymer; glucose sensor; glucoseoxidase; electrolytic copolymerization.

1 緒 言

導電性ポリマーを用いて酵素を固定したバイオセンサー、特に電解重合によるピロール修飾センサーの作製法について多くの報告^{1)~3)}がなされている。著者らは、バイオセンサー用メディエーターとして、高速な自己電子交換反応特性を有し、化学的にも安定なオスミウム錯体類^{4)~6)}を合成し、その特性について検討を行ってきた。今回は、オ

スミウム錯体のメディエーター機能を低下させることなくポリマーに担持させることを目的として、ピロール又はビニル基を有するオスミウム錯体4種類を合成した。これらを用いて、水溶液系での電解重合法を試みたところ、新規なポリマー修飾グルコースセンサーが得られたので報告する。

2 実 験

2.1 装置及び試薬

装置としては電気化学アナライザー (Bioanalytical Systems, Inc., BAS 50B/W 型) を用い、測定は作用電極

^{*} 徳島大学工学部化学応用工学科: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1^{**} 徳島大学薬学部薬学科: 770-8505 徳島県徳島市庄町 1-78

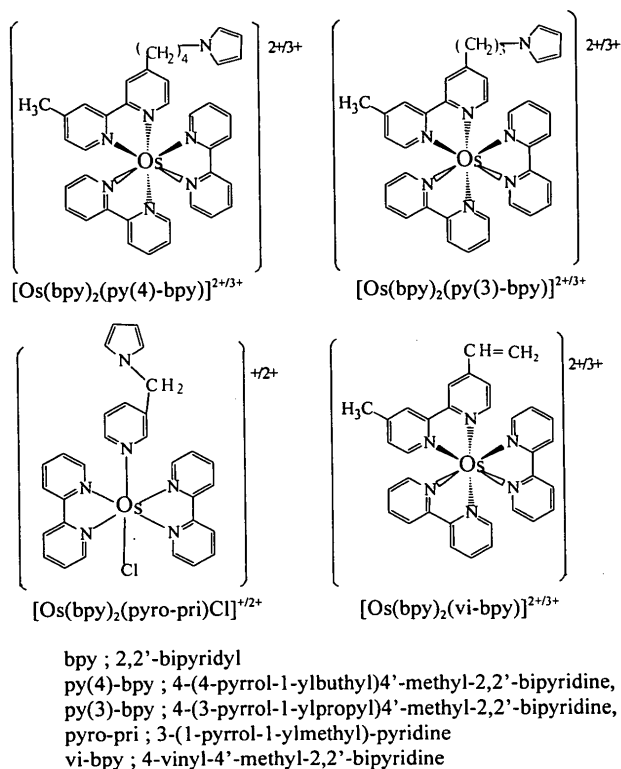


Fig. 1 Structural formula of osmium complexes

に試作ポリマー修飾酵素センサー，参照電極に銀/塩化銀電極（同社製，直径 3 mm），対極に白金電極（同社製，直径 3 mm）を用いる 3 電極方式で測定を行った．必要に応じて試料の温度調整に恒温槽（ヤマト-小松製，Coolnics Circulator CTE-22W 型）を用いた．また，試薬としてグルコースオキシダーゼ [EC 1.1.3.4] (Sigma, *Aspergillus niger* 由来，8 units/mg)，1-ピロールプロピオン酸，ピロール，アンモニウムヘキサクロオスメート（以上，Aldrich），2,2'-ビピリジル（関東化学）の特級品を用いた．その他の試薬もすべて特級品を使用した．

2.2 オスミウム錯体の合成

2,2'-ビピリジルを出発物質として Fig. 1 に示すような 4 種類のオスミウム錯体 $\{[Os(bpy)_2(py(4)-bpy)]^{2+/3+}$, $[Os(bpy)_2(py(3)-bpy)]^{2+/3+}$, $[Os(bpy)_2(pyro-pri)Cl]^{+/2+}$, $[Os(bpy)_2(vi-bpy)]^{2+/3+}\}$ を以下の方法で合成した．

$[Os(bpy)_2(py(4)-bpy)]^{2+/3+}$ の合成は，1 当量の 4-(4-pyrrol-1-ylbutyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine をエタノール 100 ml に溶解させる．これに，1 当量の $[Os(bpy)_2Cl_2]$ 水溶液を添加し，アルゴン雰囲気下で 3 時間還流する．5 倍量の NH_4PF_6 を添加して生じた沈殿物を濾過し，アルミナカラムクロマトグラフィーにより単離する．溶離液にはジクロロメタン-エーテル（体積比 1 : 1）を使用する．沈殿物を最少量のアセトニトリルに溶解し，ジエチルエーテル

より再結晶させる．濾過後，24 時間真空乾燥する．ほかのオスミウム錯体である $[Os(bpy)_2(py(3)-bpy)]^{2+/3+}$ の場合には，4-(4-pyrrol-1-ylbutyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine の代わりに 4-(3-pyrrol-1-ylpropyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine を，また $[Os(bpy)_2(pyro-pri)Cl]^{+/2+}$ の場合には 3-(pyrrole-1-ylmethyl)pyridine (pyro-pri) を用いて，同様の方法で合成を行う．また， $[Os(bpy)_2(vi-bpy)]^{2+/3+}$ の合成については，60 ml メタノール-水溶液（体積比 2 : 3）に 0.76 g 炭酸水素ナトリウムを溶解させ，1 当量の $[Os(bpy)_2Cl_2]$ を添加後，80℃ で 10 分間かくはんする．1 当量 4-vinyl-4'-methyl-2,2'-bipyridine を溶解させた後，アルゴン雰囲気下で 3 時間還流する．3 mol dm⁻³ NH_4PF_6 4 ml を添加して生成物を濾過し，アルミナカラムクロマトグラフィーにより単離する．溶離液にはジクロロメタン-エーテル（体積比 1 : 1）を使用する．ジエチルエーテルより再結晶させて濾過後，24 時間真空乾燥を行う．得られたオスミウム錯体はすべて元素分析を行い，NMR により構造確認を行った．

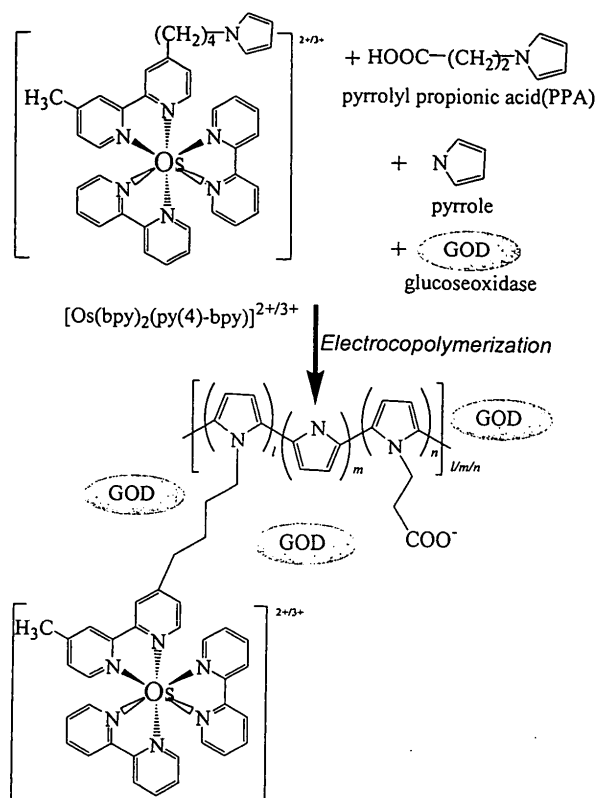
2.3 センサーの作製法及び電気化学測定

ポリマー修飾グルコースセンサーの作製法を示す．pH 7.07 リン酸緩衝液中に，合成したオスミウム錯体 0.5 mmol dm⁻³，10 mmol dm⁻³ 1-ピロールプロピオン酸及び 5 mmol dm⁻³ ピロールを溶解させる．これに，5.0 mg グルコースオキシダーゼと 100 mmol dm⁻³ 塩化カリウム溶液を加えて電解溶液を調製する．電解溶液中に白金電極を浸し，電位掃引範囲 -0.4 ~ 1.2 V vs. Ag/AgCl，掃引回数 100 回，掃引速度 100 mV s⁻¹ で電解重合を行い，センサー表面上にポリマーを修飾させる． $[Os(bpy)_2(py(4)-bpy)]$ を用いた場合の電解重合の一例を Scheme 1 に示す．電気化学測定には，サイクリックボルタンメトリー（CV 法と略），タイムベース法，回転ディスク電極を用いるボルタンメトリーを使用する．

3 実験結果及び考察

3.1 オスミウム錯体の電気化学的特性

新しく合成した 4 種類のオスミウム錯体のメディエーション効果を検討した．Fig. 2(a) に $[Os(bpy)_2(py(4)-bpy)]^{2+/3+}$ の CV を，Fig. 2(b) に 20 mM のグルコース添加した場合の CV を示す．Fig. 2 より $[Os(bpy)_2(py(4)-bpy)]^{2+/3+}$ の有効なメディエーション効果が観察された．その他の錯体 $[Os(bpy)_2(py(3)-bpy)]^{2+/3+}$ ， $[Os(bpy)_2(pyro-pri)Cl]^{+/2+}$ 及び $[Os(bpy)_2(vi-bpy)]^{2+/3+}$ についても同様の結果が得られた．このことから，今回合成したオスミウム錯体が，酵素の活性部位に接近可能な分子サイズであり，適度な親和性を有し，自己電子交換反応が有効に行われたものと考えられる．Table 1 に CV 測定より得られた



Scheme 1 Electrolytic copolymerization

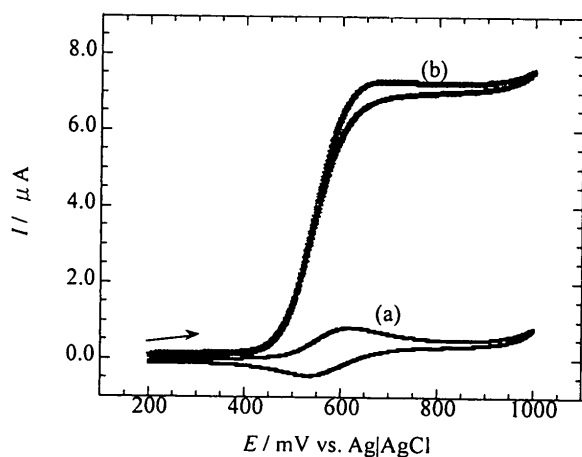
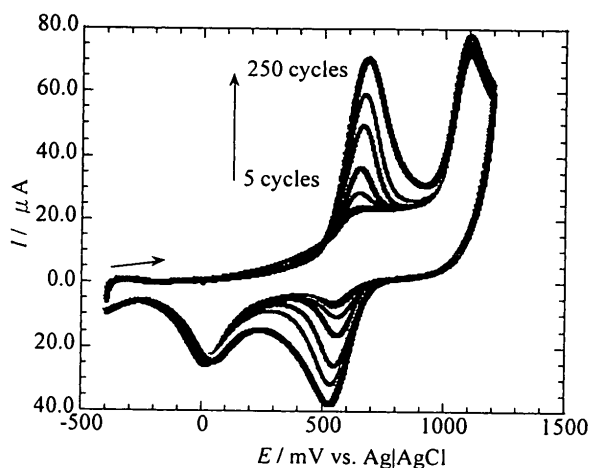


Fig. 2 Cyclic voltammograms of electro-catalytic oxidation of glucose

Sample, pH 7.07 phosphate buffer solution containing 0.5 mmol dm⁻³ [Os(bpy)₂(py(4)-bpy)]^{2+/3+}, 100 mmol dm⁻³ NaCl and 5.0 mg glucose oxidase without (a) or with 20 mmol dm⁻³ glucose (b) at 25°C. Scan rate was 10 mV s⁻¹.

Table 1 Electrochemical parameters of osmium complexes

Osmium complexes	E_0' / mV vs. Ag/AgCl	ΔE / mV vs. Ag/AgCl
[Os(bpy) ₂ (py(4)-bpy)] ^{2+/3+}	579.5	83.0
[Os(bpy) ₂ (py(3)-bpy)] ^{2+/3+}	572.0	94.0
[Os(bpy) ₂ (pyro-pri)Cl] ⁺²⁺	263.0	70.0
[Os(bpy) ₂ (vi-bpy)] ^{2+/3+}	588.5	51.0

Fig. 3 Electrolytic copolymerization of [Os(bpy)₂(py(4)-bpy)]^{2+/3+} and PPA

Sample, 5.0 ml of pH 7.07 phosphate buffer solution containing 0.5 mmol dm⁻³ [Os(bpy)₂(py(4)-bpy)]^{2+/3+}, 10 mmol dm⁻³ PPA, 5.0 mg glucose oxidase and 100 mmol dm⁻³ KCl. Scan rate was 100 mV s⁻¹.

を有するために酸化還元電位は比較的低い値 (263.0 mV vs. Ag/AgCl) を示した。これら 4 種類のオスミウム錯体をセンサー表面上に修飾させたところ, [Os(bpy)₂(py(4)-bpy)]^{2+/3+} を用いた場合に最も良好な結果が得られた。以後 [Os(bpy)₂(py(4)-bpy)]^{2+/3+} を用いて実験を行うことにした。

3.2 ポリマー濃度の検討

リン酸緩衝液中にオスミウム錯体と 1-ピロールプロピオン酸 (重合仕込濃度比 1 : 20) 及びグルコースオキシダーゼを添加し, 白金電極表面で電解重合を行った。このときの CV を Fig. 3 に示す。1-ピロールプロピオン酸はカルボキシル基のプロトン化作用でマイナス帯電となり, プラスイオンであるオスミウム錯体と親和性があると考えられる。電位掃引を繰り返すと錯体の電流値が上昇し, 電極表面上に酸化還元ポリマーが形成されるのが確認できた。しかし, 試作した本センサーをグルコース測定に適用したところ, 期待した触媒効果が得られなかった。これはポリマー鎖長が短いために酵素の抱合がなされなかったためであ

それぞれのオスミウム錯体の電気化学的パラメーターを示す。[Os(bpy)₂(py(4)-bpy)]^{2+/3+}, [Os(bpy)₂(py(3)-bpy)]^{2+/3+}, [Os(bpy)₂(vi-bpy)]^{2+/3+} はトリスピリジンオスミウム錯体由来する酸化還元電位, 579.5, 572.0 及び 588.5 mV vs. Ag/AgCl が得られた。[Os(bpy)₂(pyro-pri)Cl]⁺²⁺ は Cl 基

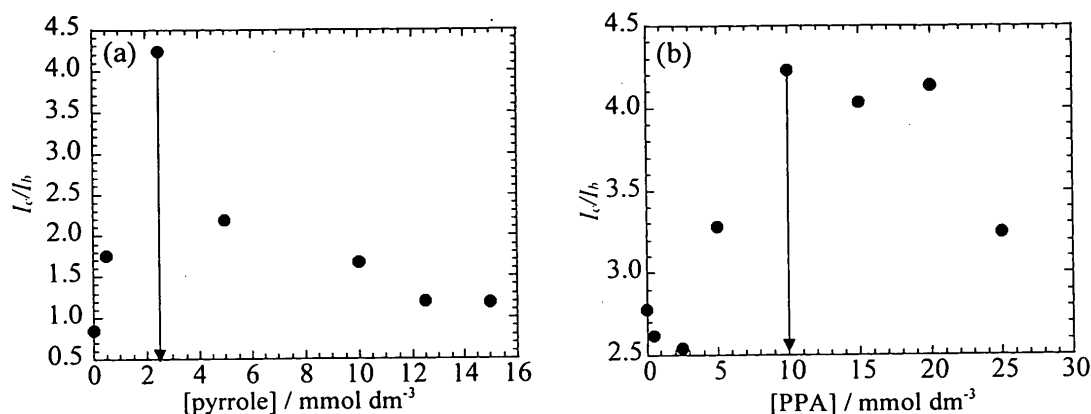


Fig. 4 Effects of polymer concentration

I_c/I_b vs. [pyrrole] plot (a) and I_c/I_b vs. [PPA] plot (b) for electro-catalytic oxidation of glucose with Os complex/PPA/pyrrole/glucose oxidase modified Pt electrode. I_c was the measured current value and I_b was blank current value.

ろうと考え、ポリマーの鎖長を延長するために、ピロールを添加することにした。重合仕込濃度比の検討結果を Fig. 4(a) に示す。ピロール濃度を 0~15 mmol dm⁻³ の範囲で変えて、センサーの触媒応答電流値/空試験電流値 (I_c/I_b) とピロール濃度の関係を検討した。ピロール濃度が 2.5 mmol dm⁻³ のとき最大の触媒効果が得られた。同様に 1-ピロールプロピオン酸濃度については、0~25 mmol dm⁻³ の範囲で検討したところ、10 mmol dm⁻³ で最も高い触媒効果が得られた [Fig. 4(b)]。したがって、ポリマー修飾のための重合仕込濃度比は、オスミウム錯体:1-ピロールプロピオン酸:ピロールが 1:20:5 で実験を行うことにした。

3・3 電解重合時の掃引回数の影響

酸化還元ポリマー膜の厚さは、基質の透過性や妨害物質の除去などに影響があり、重要である。膜厚は電解重合時の掃引回数でコントロールできるものと考え、電解重合時の CV の掃引回数の影響を検討した。掃引回数 5~150 回の範囲では、100 回のときに触媒効果が最大値を示した。これ以上では膜厚が厚くなり基質の透過性が低下した。したがって、掃引回数は 100 回で実験を行うことにした。

3・4 定量可能濃度範囲

試作したセンサーを用いて、20 mmol dm⁻³ グルコースを添加した場合 (b) としない場合 (a) の CV を Fig. 5 示す。これよりピロールを添加して電解重合することにより、グルコースオキシダーゼがポリマー間に抱合できたものと考え、定量可能なグルコース濃度範囲を検討した。タイムベース法により検量線を作成したところ、Fig. 6 に示すように、ミカエリス-メンテン型の応答が得られた。見掛けのミカエリス定数は 27.2 mM であり、0.9~100

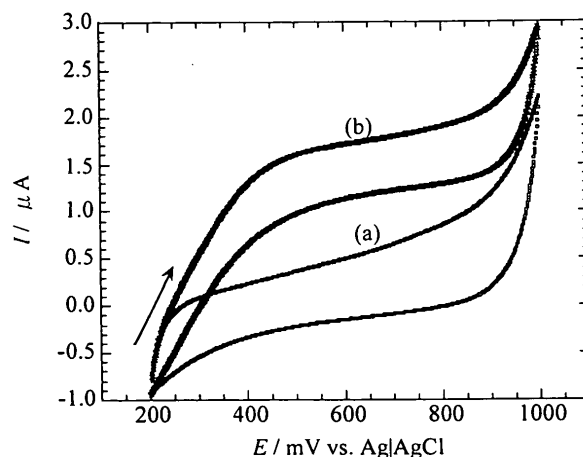


Fig. 5 Cyclic voltammograms of electro-catalytic oxidation of glucose with [Os(bpy)₂(py(4)-bpy)]^{2+/3+}/PPA/pyrrole/glucose oxidase modified Pt electrode

Sample, pH 7.07 phosphate buffer solution containing 100 mmol dm⁻³ NaCl without (a) or with 20 mmol dm⁻³ glucose at 25°C. Scan rate was 10 mV s⁻¹.

mmol dm⁻³ の濃度範囲のグルコースが定量可能であった。測定感度はオスミウム錯体再生速度に依存しているため、回転ディスク電極を用いるボルタンメトリーにより二次速度定数の算出を行った (Fig. 7)。低回転速度 (0.15~22 $\omega^{1/2}/\text{rpm}^{1/2}$) においては良好な直線性を示したが、高回転では直線から外れ、拡散層の厚さが回転速度に依存し、基質拡散が一定の拡散速度から制限されていることを示した。クロノクーロメトリーより算出したオスミウム錯体の固定量は 4.78×10^{-11} mol cm⁻²、Koutecky-Levich の理論式から算出した二次速度定数は、 1.53×10^4 M⁻¹ s⁻¹ である。既に報告されているメディエーターの二次速度定数⁷⁾、Ni cyclam (0.78×10^4 M⁻¹ s⁻¹)、K₃Fe(CN)₆ (0.57×10^4

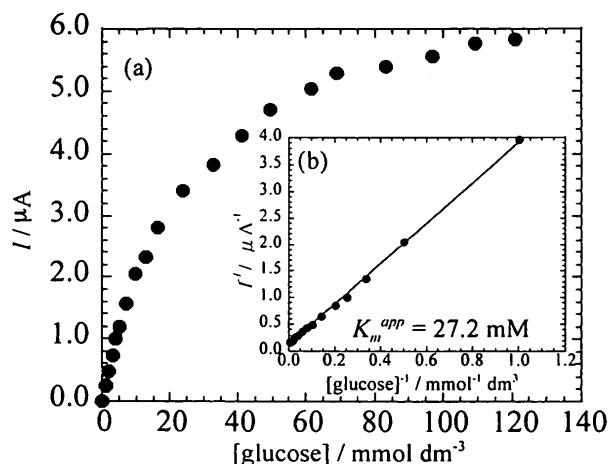


Fig. 6 Calibration plots for oxidation of glucose with Os complex/PPA/pyrrole/glucose oxidase modified Pt electrode (a) and Lineweaver-Burk plot (b).

Sample, pH 7.07 buffer solution containing 100 mmol dm⁻³ NaCl at room temperature. Potential was 500 mV vs. Ag/AgCl.

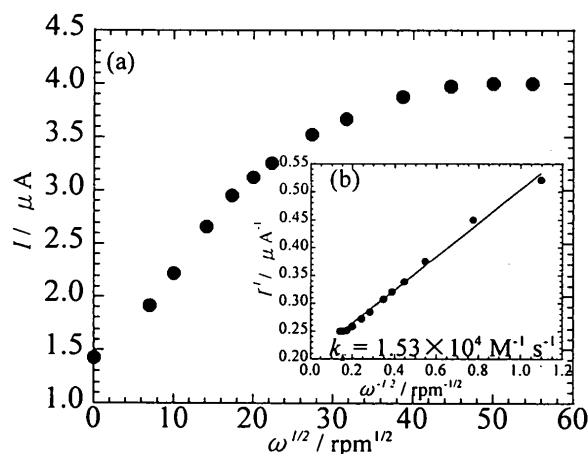


Fig. 7 Levich plots of the electrocatalytic response with [Os(bpy)₂(py(4)-bpy)]^{2+/3+}/PPA/pyrrole/GOD modified Pt electrode

Sample, pH 7.07 PBS containing 100 mmol dm⁻³ NaCl and 0.99 mmol dm⁻³ glucose at room temperature.

M⁻¹ s⁻¹), ヒドロキノン (1.49 × 10⁴ M⁻¹ s⁻¹), Re(DA-BPY)₃ (2.04 × 10⁴ M⁻¹ s⁻¹),あるいは Os(DMO-bpy)₃ (2.59 × 10⁴ M⁻¹ s⁻¹) などと比較しても, 今回合成したオスミウム錯体が電気触媒として十分機能していることが明らかになった。

3.5 溶存酸素の影響

実際試料中での測定においては, 測定溶液中の溶存酸素が電子ドナーとして働く可能性があるために, 競合反応物質として取り扱われ, 溶存酸素の影響を受けないセンサー

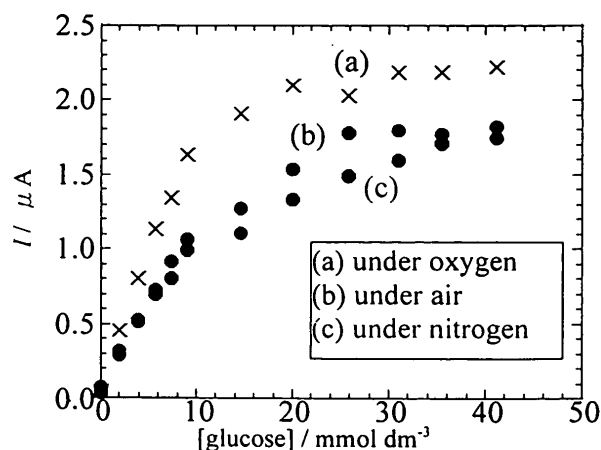


Fig. 8 Steady state electro-catalytic oxidation currents of glucose with Os complex/PPA/pyrrole/glucose oxidase modified Pt electrode

Sample, pH 7.07 buffer solution containing 100 mmol dm⁻³ NaCl at room temperature.

特性が望まれている。そこで, [Os(bpy)₂(py(4)-bpy)]^{2+/3+}修飾センサーを用いて試料中の溶存酸素の影響を検討した。測定は窒素, 酸素並びに空気飽和下で行った。結果を Fig. 8 に示す。プロット (a) は酸素飽和下, プロット (b) は空気飽和下, プロット (c) は窒素飽和下における電流値とグルコース濃度の関係である。これらの結果よりグルコース 0~10 mmol dm⁻³ の低濃度域では, 溶存酸素の影響を受けないことが明らかになった。

3.6 共存物質の影響

妨害物質としてアスコルビン酸及び尿酸の影響を検討した。生理学的最大共存濃度である 0.11 mmol dm⁻³ のアスコルビン酸, あるいは 0.48 mmol dm⁻³ の尿酸が共存しても, ほとんど影響は認められなかった。アスコルビン酸や尿酸は水溶液中では負イオンとなり, 一方, ポリマー中の 1-ピロールプロピオン酸はマイナス帯電となっているために, 静電的な反発により妨害が抑制されたものと考えられる。

3.7 センサー寿命

最後に, センサー寿命について検討した。作製 4 日間は応答電流値が減少し, 作製時に比べ 20% の減少が認められた。しかし, 4 日から 12 日目までの 9 日間は安定した電流値を示した。ピロール膜に酵素とメディエーターを担持させて作製したセンサーとしては, 比較的長寿命であった。なお, センサーは pH 7.07 リン酸緩衝液中に 4℃ で保存した。

(2002 年 5 月, 第 63 回分析化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) G. Fortier, E. Brassard, D. Belanger: *Biosens. Bioelectron.*, **5**, 473 (1990).
- 2) A. Guiseppi-Elie, S. Brahim, D. Narinesingh: *J. Macromolec. Sci., Pure Appl. Chem.*, **A38**, 1575 (2001).
- 3) T. Inoue, J. R. Kirchhoff: *Anal. Chem.*, **74**, 1349 (2002).
- 4) K. Miyata, J. B. Metson, J. Nishita, S. Takahashi, T. Moriga, J. Motonaka, I. Nakabayashi: *Anal. Sci.*, **13**, 303 (1997).
- 5) J. Motonaka, T. Shinno, K. Maruyama, Y. Nakabayashi, Y. Mishima, S. Ikeda: *Rep. Progr. Polym. Phys. Japan.*, **41**, 563 (1998).
- 6) J. Motonaka, T. Shinno, T. Shiomi, K. Maruyama, Y. Mishima, Y. Nakabayashi: *Anal. Sci.*, **17**, 1367 (2001).
- 7) K. Hirano, H. Yamato, K. Kunimoto, M. Ohwa: *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 315 (2002).

要 旨

オスミウム錯体のメディエーター機能を低下させることなくポリマーに担持させることを目的として、ピロール又はビニル基を有する錯体4種類を合成した。合成したオスミウム錯体にはいずれも良好な触媒効果が観察された。このオスミウム錯体を、1-ピロールプロピオン酸とピロールを用いてグルコースオキシダーゼとともに白金電極表面に修飾し、グルコース測定用センサーを試作した。電解重合条件の検討、センサーの触媒応答、溶存酸素の影響、測定可能なグルコースの濃度範囲、センサー寿命などについて検討した。その結果、メディエーターとして $Os(bpy)_2(py(4)-bpy)]^{2+/3+}$ を用いた場合、オスミウム錯体:1-ピロールプロピオン酸:ピロールの重合仕込みモル比が1:20:5のときに最大応答電流値が得られた。最適条件を用いてグルコース測定を行ったところ典型的なミカエリス-メンテン型の応答が得られ、 $0.9 \sim 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ の濃度範囲でグルコース定量が可能であった。センサー寿命については、4日間は電流値の減少がみられたが、その後、9日間は安定して使用可能であった。