19p-A2-16

クロマトグラフィーペーパーとフロー制御装置を用いた酵素センサによるアルコールガスの電気化学的検出

Amperometric Detection of Alcohol Gas Using a Flow System and Chromatography Paper with Immobilized Enzymes

立命院理工，○呉竹 龍巳, M. Muhammad Syakirin，宇野重康

Ritsumeikan Univ., ○Tatsumi Kuretake, M. Muhammad Syakirin and Shigeyasu Uno

E-mail: suno@fc.ritsumei.ac.jp

1. 導入

今日の飲酒運転の深刻化に伴い、酵素を利用したバイオアルコールセンサの開発が進められている。バイオセンサで用いられる酵素電極は、主に酵素を電極に固定して利用される[1]。しかし、従来の酵素固定化法では電極に薄膜を形成する必要があり、多くの手間と準備を要する[2]。そこで我々は酵素を含んだクロマトグラフィーペーパー(ChrPr)を電極上に設置することで、簡易かつ短時間で酵素電極法の実現が可能であると考えた。本研究では、酵素とメディエータを含んだ ChrPr を電極上に設置することでバイオアルコールセンサを実現し、エタノールガスの有無による電流量の変化を観察した。

2. 実験方法

電極は塩化ビニル(PVC)板で覆った プリント基板(PCB)上に作成した。作用電極(WE)、対向電極(CE)にはそれぞれカーボンペーストを用い、参照電極(RE)には Ag/AgCl インクを塗布し、一晩乾燥させた(Fig. 1(a))。ChrPr を用いた酵素電極作成手順では、酵素であるアルコールオキシダーゼ(70 U/mL, From Picha Pastris, No: 190155, MP BIOMEDICALS), ペルオキシダーゼ(70 U/mL, From horseradish, No:9003-99-0, Wako), メディエータである $K_4[Fe(CN_6)]$(100 mM, Wako)を含んだリン酸緩衝液(PBS)(100 mM, pH = 7.0, Wako)に ChrPr を浸した後、冷暗所(4 °C)で一日保存して乾燥させた。今回のエタノール測定は、酵素反応によるエタノールの酸化により生成された $K_3[Fe(CN_6)]$を測定することによって間接的にエタノールを検出するという方法である[3]。はじめに、酵素とメディエータを含んだ ChrPr を電極上に設置した。次に Fig. 1(b), (c)のようなエタノールガスの流れを制御するためのフロー制御装置を電極に装着し、初期電位として RE に対して– 200 mV のステップ電圧を印加するクロノアンペロメトリー測定を開始した。測定では、15 μL の PBS を ChrPr に滴下したのち、100, 200, 300 s 時でエタノールが含まれない気体(WoEth)を、400 s にエタノール気体(WEth)を注入し、その後の還元電流の増加をそれぞれ観察した。測定装置は ALS/CH Instruments Electrochemical Analyzer Model 610DR (BAS)を使用した。

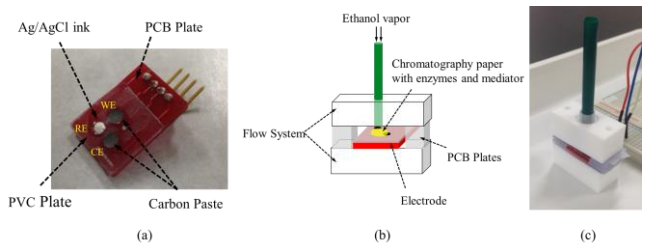


Fig. 1 (a) The diameter of all three electrodes are 2.8 mm on a PCB with a measurement of 2.2 mm * 1.6 mm. (b) Modified ChrPr was placed on the electrode and was soaked with PBS solution before flow system was mounted on the top. (c) Photograph of flow system.

3. 結果と考察

Fig. 2(a), (b)は本実験の結果とそのコットレルプロットである。Fig. 2(a)に示すように、WoEth 注入後では還元電流の増加は観測されなかったのに対し、WEth 注入後では還元電流の増加が確認された。Fig. 2(b)で、赤色の破線はガスを吹き込む以前のコットレルプロットから導いた直線であり、WoEth 注入直後は直線から外れるものの、その後は直線に近づき還元電流の増加は見られなかった。一方、WEth 注入後では直線から大幅に外れ、t = 625 s では約 3.86 倍の還元電流の増加が確認された。このように、コットレルプロットを用いることで、空気注入による一時的な電流変化とアルコールによる電流変化を明確に区別することができる。以上より、本実験手法によるエタノールガスの検出が可能であると考えられる。

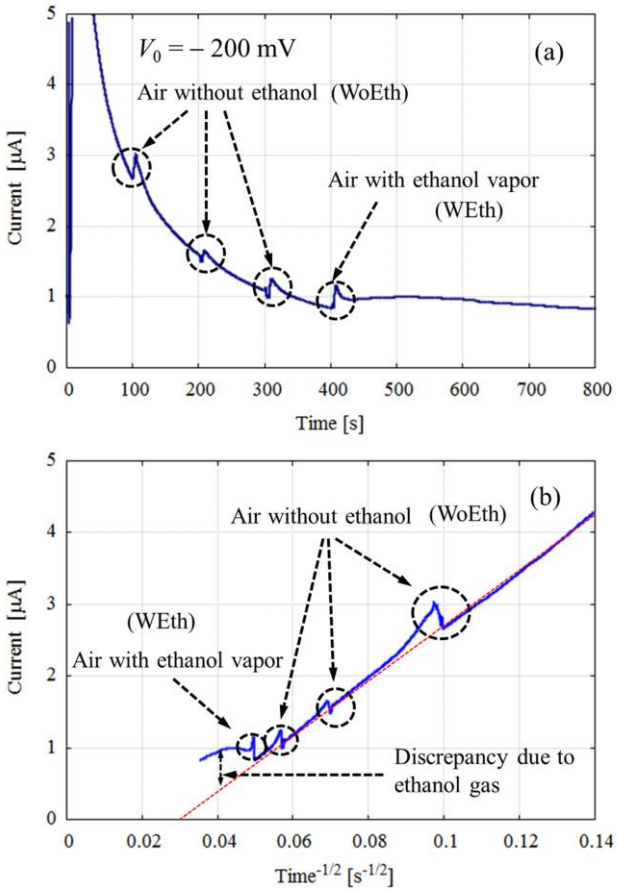


Fig. 2 (a) CA measurement results. At t = 100, 200, and 300 s, WoEth was released, while at t = 400 s, WEth was released. (b) Cottrell plot graph. Two current values before any gas is released was taken, at t = 50 s and 100 s, and the gradient value of the points was calculated. This gradient value is used to create the red dotted line.

4. 結論

酵素が含まれた ChrPr を用いてエタノールガスの検出を行った結果、本手法が酵素電極法として活用できることが確認された。将来、呼気中アルコールの高精度検出が可能なバイオアルコールセンサの実現が見込まれる。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 26289111 の助成を受けたものである。

参考文献

[1] 六車 仁志; バイオセンサー入門, コロナ社, p.28 (2003)

[2] 軽部 征夫; バイオセンサー, シーエムシー出版, p.24 (2002)

[3] E.C. Rama *et al.*, *Analytica Chimica Acta* 728 (2012) 69–76.

© 2014 年　応用物理学会