スマートフォン取付型センシングシステムによる クロマトグラフィーペーパー酵素電極を用いたエタノールガスの電気化学的検出

Electrochemical Detection of Ethanol Gas Using Chromatography Paper with Immobilized Enzymes by Sensing System Attached to a Smart Phone

立命館理工 [1]，日立製作所 [2]，○河原翔梧 [1]，渕上幸男 [1]，下川翔士 [1]，中村瑛甫 [1]，呉竹龍巳 [1]，釜堀政男 [2]，宇野重康 [1]
Ritsumeikan Univ.[1], Hitachi Ltd.[2], °Shogo Kawahara[1], Yukio Fuchigami[1], Shoji Shimokawa[1], Yosuke Nakamura[1], Tatsumi Kuretake[1], Masao Kamahori[2], and Shigeyasu Uno[1]
E-mail: re0039ke@ed.ritsumei.ac.jp, suno@fc.ritsumei.ac.jp

1. 背景

今日、在宅医療の広がりにより、呼気分析による非侵襲的な病状診断が注目され、中でも酵素を利用した選択性に富むバイオガスセンサの開発が進んでいる。一般的にバイオガスセンサには、電極部に酵素を固定し、加えて液相が確保された酵素電極が用いられるが、従来の酵素電極作製法では専用機器を用いるため、多くの時間とコストを要する [1]。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、酵素固定と液相確保を同時に実現する簡易かつ安価な酵素電極 (ChrPr 酵素電極) の作製に取り組んでいる。さらに今回、測定装置として身近なスマートフォンを利用 [2] することで小型化を実現し、より幅広い現場での活用を目指した。本研究では、センシングシステムとして我々が独自に設計した測定用カスタム CMOS チップを、ChrPr 酵素電極、iPod touch に接続し、クロノアンペロメトリ (CA) 法によるエタノールガス測定を行った。

2. 実験方法

本研究でのエタノールセンシングには、アルコールオキシダーゼ (AOD: 70U/mL, CAS RN 9073 - 63 - 6, From Picha Pastris, SIGMA - ALDRICH)、ペルオキシダーゼ (HRP: 70U/mL, No: 9003 - 99 - 0, From horseradish, Wako) およびメディエータである $K_4[Fe(CN)_6]$ (Ferro: 100mM, Wako) を用いる。始めに AOD の触媒反応によりエタノールが溶存酸素により酸化され、過酸化水素が生成される ($C_2H_5OH + O_2 \rightarrow CH_3CHO + H_2O_2$)。次に HRP の触媒反応により、酸化型メディエータ $[Fe(CN)_6]^{3-}$ (Ferri) が生成される ($H_2O_2 + 2[Fe(CN)_6]^{4-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O + 2[Fe(CN)_6]^{3-}$)。そして最終的に電極と Ferri との酸化還元反応 ($2[Fe(CN)_6]^{3-} + 2e^- \rightarrow 2[Fe(CN)_6]^{4-}$) を観測することで、エタノールを間接的に検出する。本測定で使用する測定系を Fig. 1(a) に示す。ChrPr 酵素電極は酵素層、メディエータ層、電極より構成される。各層は、直径 6mm の ChrPr (No. 3001 - 861, Whatman) を AOD, HRP を含むリン酸緩衝液（PBS: 100mM, pH = 7.0）と Ferro を含む PBS にそれぞれ含浸させ (Fig. 1(b))、共に冷暗所 (温度 4℃) で 12 時間乾燥させることで形成する。続けて、スクリーン印刷カーボン電極 (SPCEs: DropSens, DRP - 110) の三電極上に酵素層、メディエータ層の順に積層することで ChrPr 酵素電極 (ChrSPCEs) を作製する。使用する iPod touch (MD714J/A, iOS 7.1.1, Apple) には、測定結果を表示・保存するためのアプリケーションがインストールされており、イヤホン端子に CMOS チップを接続することで、初期電位 0V、サンプリング周期 0.4096s の条件下で CA 測定を行える仕様となっている。CMOS チップは電源回路、ポテンショスタット、ΔΣ変調器を内蔵するカスタム IC で構成される (Fig. 1(c))。電源回路では、AC/DC 変換を行い、iPod touch から回路全体への電力供給を可能とする。ポテンショスタットでは、参照電極 (RE) に対して作用電極 (WE) に一定の電位 0V を印加し、作用 - 対向電極 (CE) 間に流れる電流量を読み取る。ΔΣ変調器では、ポテンショスタットで読み取った電流信号をパルス密度変調 (PDM) によって AD 変換し、iPod touch に転送する。測定するエタノールガスは、酒気帯び運転の呼気分析を想定し、判断値であるエタノール濃度 78ppm の気体 (WEth) を用い、0ppm である室内空気 (WoEth) との測定結果を比較する。

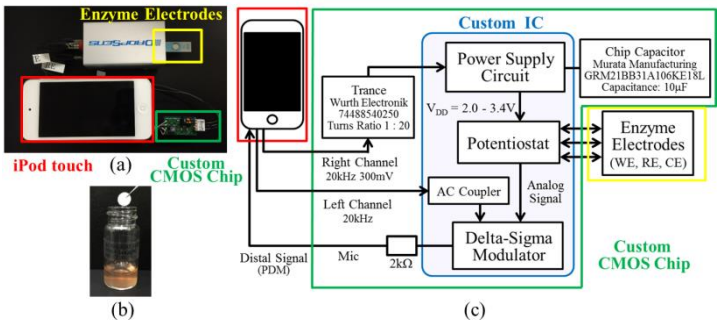

Fig. 1 (a) Photograph showing the connection of iPod touch, Custom CMOS chip and Enzyme Electrodes. (b) ChrPrs immersed in a solution containing Enzyme and Mediator. (c) Block diagram of Custom CMOS chip.

3. 結果と考察

測定手順として、ChrSPCEs の各層を 10μL の PBS で完全に湿らせ、アプリケーションで測定を開始する。測定開始 50s 後、30mL の測定ガスをシリンジで酵素固定層に吹きかけ (Fig. 2(a))、還元電流量の変化を読み取る。測定開始から 120s までの CA 測定結果を Fig. 2(b) に示す。横軸の数値はサンプリングカウントであり、サンプリング周期 0.4096s を乗算することで時間 [s] として表される。WoEth に比べ、WEth では、吹きかけた約 20s 後から還元電流の増加が確認され、70s 後では、増加する直前の約 1.7 倍の電流量が観測された。この還元電流 $I(t)$ [A] の推移は、コットレルの式 $I(t) = -nFAC_{OX}(D_{OX}/\pi t)^{1/2}$ (n: 反応電子数, F: ファラデー定数 [C/mol], A: 電極面積 [m^2], C_{OX}: 酸化型メディエータ濃度 [mol/m^3], D_{OX}: 拡散係数 [m^2/s], t: 時間 [s]) で表され、センシング原理に従い、C_{OX} が増加したためであると考えられる。

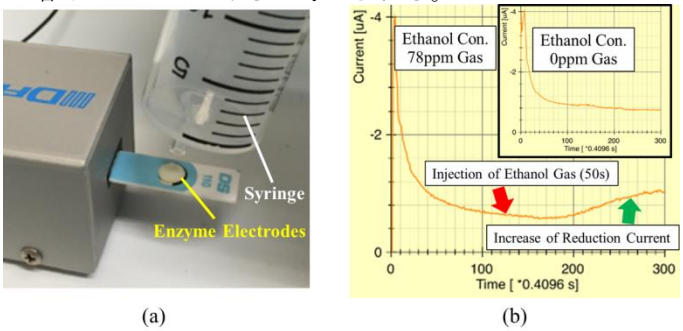

Fig. 2 (a) Photograph showing experimental setup in ethanol gas injection. (b) Screenshot of iOS application in CA measurement.

4. 結論

ChrPr 酵素電極を利用し、スマートフォン取付型センシングシステムでエタノールガス検出を行った結果、酒気帯び運転の判断が従来よりも容易に、かつ所在を選ばず行えることが確認された。今後、酵素を変更するだけで様々な呼気中成分の検出に応用可能であると見込まれる。

謝辞

本研究は日立製作所との共同研究および JSPS 科研費 26289111 の助成により行われた。

参考文献

[1] 軽部征夫；バイオセンサー，シーエムシー出版，p.24 (2002)
[2] Ye-Sheng Kuo et al., Proceedings of the First ACM Symposium on Computing for Development, December 17-18, 2010, London, United Kingdom [doi>10.1145/1926180.1926210]

© 2016年 応用物理学会