



研究ノート

‘ぬれる’炭素電極の作製とその生体分析化学への応用

前田 初 男*

Preparation of Carbon Electrodes Having Biocompatible Surfaces and Their Application to Bio-Analytical Chemistry

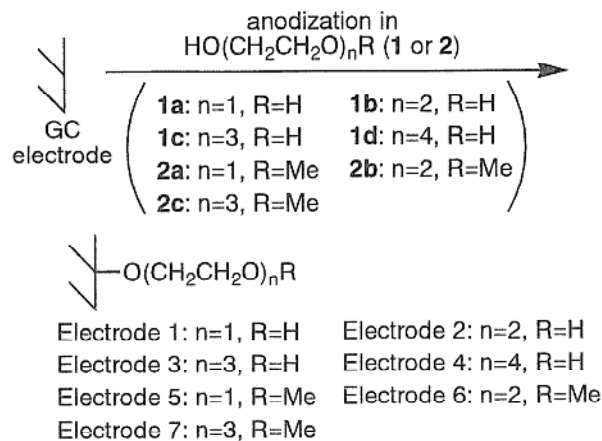
Key Words : carbon electrode, surface modification, biocompatible surface, bio-analytical chemistry

1. はじめに

電気化学分析に最も汎用されている炭素電極は sp^2 炭素系からなるため、その表面は疎水的である。その結果、含タンパク質試料を対象とする生体分析化学に炭素電極を用いる電気化学測定系を適用すると、タンパク質の非可逆的な吸着により電極表面が不活性化され、再現性良く精度の高い分析値が得られない場合が多い。この問題点の有効な解決法は、炭素電極表面の‘ぬれ’をよくすることである。これまで炭素電極表面の‘ぬれ’の改善は、Nafion等の親水性ポリマーによる被覆(ポリマー法)によりもっぱら行なわれてきた¹⁻⁸⁾。しかし、ポリマー被覆炭素電極は、ポリマー膜内での物質移動が非常に遅いため、過酸化水素等の非常に小さい分子を対象とする限られた電気化学分析にしか有効利用できない。従って、生体分析化学には、親水性の小さい分子を用いて表面修飾した炭素電極がより実用的だと考えられる。ところが、この条件を満たす修飾炭素電極の簡便かつ効果的な作製法はこれまで確立されていなかった。このような背景の下、我々は生体分析化学への応用を指向する‘ぬれる’炭素電極の開発研究を行ってきた。本稿では、その研究の成果について紹介する。

2. ‘ぬれる’炭素電極の作製とその表面特性の評価

我々はグラッシーカーボン(GC)電極を1-アルカノール中陽極酸化処理すると、アルカノール分子がエーテル結合を介してGC電極表面に固定化されることを見出した⁹⁻¹¹⁾。そこで、この方法を用いて生体適合性分子であるオリゴエチレングリコール(1)およびそのモノメチルエーテル体(2)により表面修飾したGC電極(Electrodes 1~7)を作製し(図1)、それらの‘ぬれる’炭素電極としての可能性を検討した¹²⁾。修飾電極の‘ぬれ’は、水滴の接触角により評価した。その結果、修飾剤1または2におけるエチレングリコールユニットが多くなるほど、修飾GC電極の表面が親水的になることが明らかになった。さらに電極表面に対するタンパク質の吸着挙動を比較検討することにより、これらの修飾GC電極表面の生体適合性も評価した。タンパク質の吸着挙動の検討は、電極を牛血清アルブミン(BSA)溶液と処理する前後に観察されるサイクリックボルタムメトリー(CV)におけるカフェー酸(CA)の応答を用



* Hatsu MAEDA
1959年6月14日生
1988年大阪大学大学院薬学研究科後期課程修了
現在、大阪大学大学院・薬学研究科・分子反応解析学分野、助教授、薬学博士、電気分析化学、酵素分析化学
TEL 06-6879-8206
FAX 06-6879-8206
E-Mail h-maeda@phs.osaka-u.ac.jp

図1 ‘ぬれる’GC電極の作製法とその表面構造の模式図

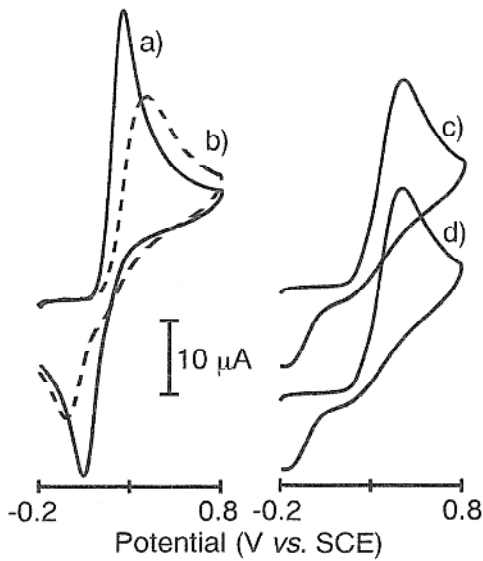


図2 未修飾GC電極(a, b)とElectrode 3(c, d)をBSA溶液と処理する前(a, c)と処理した後(b, d)に各々の電極において観察されたカフェー酸のサイクリックボルタモグラム

いて行なった。未修飾電極において観察されたCAのレドックス波(図2a)は、BSAと処理するとその吸着により顕著に抑制された(図2b)。一方、Electrode 3を用いた場合、表面修飾によりCAのCV応答は未修飾電極を用いた場合に比べて小さくなるものの、BSAとの処理による影響はほとんど観察されなかった(図2c, 2d)。Electrode 3と同様に、他の修飾GC電極(Electrodes 1, 2, 4~7)もBSAの吸着に対して優れた抵抗性を示した。その抵抗性は修飾電極の表面が最も親水的であったElectrode 4が最も優れていた。しかし、電気化学分析に利用する場合の感度をも考慮するとElectrode 3が最適であった。

3. 'ぬれる'炭素電極の生体分析化学への応用

Electrode 3を組み込んだ電気化学的検出器(ECD)を用いて尿酸、アセトアミノフェンおよびBSAの混合液についてHPLC分析を行なった¹²⁾。図3bに検出電位0.6V(vs. Ag/AgCl)で得たクロマトグラムを示す。0.45および0.6Vのどちらの検出電位においても、BSAの影響なく両化合物を定量分析できた。未修飾電極を用いた場合、検出電位0.45VではBSAの電極表面への吸着のため両化合物のピーク面積は分析を繰り返す毎に小さくなり、検出電位0.6Vでは図3aに示すようにBSA由来のピークによ

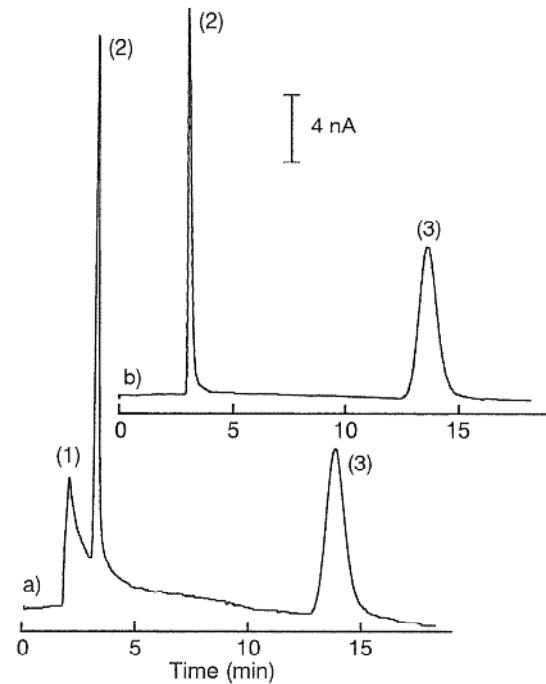


図3 未修飾電極(a)またはElectrode 3(b)を組み込んだECD-HPLCにより得たクロマトグラム：ピーク(1) BSA, (2) 尿酸, (3) アセトアミノフェン

り尿酸の分析が妨げられた。この結果から、未修飾GC電極を用いたECD-HPLCにおいて観察された共存タンパク質の悪影響はElectrode 3を用いることにより排除できることが明らかになった。

Electrode 3を用いるECD-HPLCにおけるアセトアミノフェンの検出感度は、未修飾GC電極を用いた場合に比べて15%程度減少した。そこで、この点を改良するため、1cで修飾する前にGC電極を水中で陽極酸化処理し(図4)、アセトアミノフェンの検出感度に対するその前処理の効果を検討した¹³⁾。その結果、この方法を用いて作製したElectrode 8はECD-HPLCにおいて未修飾GC電極と同様な検出感度を与えることが明らかになった。検出電位

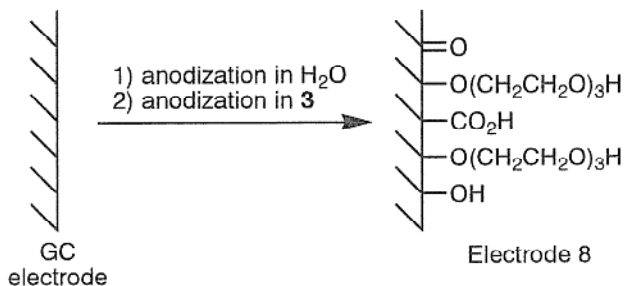


図4 Electrode 8の作製法とその表面構造の模式図

0.6VでこのHPLCシステムを用いた場合、アセトアミノフェンについて60nM-10 μ Mで良好な検量線が得られ、検出限界は20nMであった。アセトアミノフェン錠を服用した健康人から服用後2時間経過時に採取した尿を単に希釈して調整した試料について得たクロマトグラムを図5に示す。この尿サンプル中のアセトアミノフェン濃度は1.94 μ M(RSD=2.9%)であった。この結果はElectrode 8を用いるECD-HPLCが満足すべき感度ならびに再現性を有する簡便な尿分析法となることを示す。

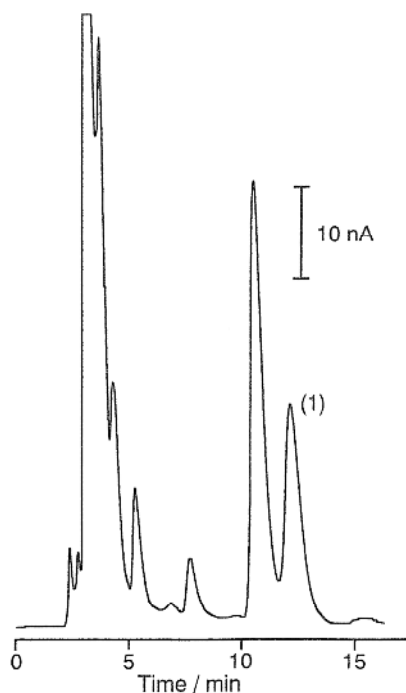


図5 アセトアミノフェン錠を服用した健康人から採取した尿について Electrode 8 を組み込んだ ECD-HPLC を用いて得たクロマトグラム：ピーク (1) アセトアミノフェン

4. お わ り に

本研究では、1 または 2 中で陽極酸化処理することにより、'ぬれる' GC電極が簡単に作製できることを明らかにするとともに、含タンパク質試料の分析に非常に有効なECD-HPLCシステムの開発を行った。最近、1c 中での陽極酸化処理の条件を工

夫することにより、Electrode 3 表面に固定化された1c分子の末端水酸基がカルボキシル基にまで酸化されることを見出した¹⁴⁾。この知見に基づくと、'ぬれる' GC電極表面にアミノ基を有する分子をアミド結合を介して固定化できると期待される。今後、この仮説を検証し、生体分析化学に利用可能な'ぬれる' 機能性分子修飾炭素電極の開発へと本研究を展開していきたいと考えている。

参 考 文 献

- 1) G. Sittampalam et al., *Anal. Chem.*, 55, 1608-1610 (1983).
- 2) J. Wang et al., *Anal. Chem.*, 57, 1536-1541 (1985).
- 3) J. Wang et al., *Anal. Chem.*, 58, 402-407 (1986).
- 4) B. Hoyer et al., *Anal. Chem.*, 59, 1608-1614 (1987).
- 5) B. Hoyer et al., *Anal. Chem.*, 59, 2839-2842 (1987).
- 6) J. Wang et al., *J. Electroanal. Chem.*, 226, 287-296 (1989).
- 7) J. Wang et al., *Anal. Chem.*, 61, 1397-1400 (1989).
- 8) J. Wang et al., *Electroanalysis*, 2, 383-387 (1990).
- 9) H. Maeda et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 1080-1082 (1992).
- 10) H. Maeda et al., *Anal. Sci.*, 10, 963-965 (1994).
- 11) H. Maeda et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 44, 2294-2299 (1996).
- 12) H. Maeda et al., *Anal. Sci.*, 13, 721-727 (1997).
- 13) H. Maeda et al., *Anal. Sci.*, 16, 293-298 (2000).
- 14) H. Maeda et al., *Anal. Sci.*, 15, 531-536 (1999).

