

報 文

導電性中空糸膜電極を用いる電気化学検出法による糖検出感度の検討

五十嵐 治^①, 宇都 正幸^②, 井上 貞信^③, 星 座^④,
菅原 俊継^⑤, 木村 主幸^⑤, 三澤 顕次^⑤, 有澤 準二^⑤

Study of a metal-coated hollow-fiber membrane electrode for sugar detection by an amperometric detection method

Osamu IGARASHI¹, Masayuki UTO², Sadanobu INOUE²,
Suwaru HOSHI², Toshitsugu SUGAWARA³, Kazuyuki KIMURA³,
Kenji MISAWA³ and Junji ARISAWA³

¹ NIX, Inc., 2-3-3, Minatomirai, Nish-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 220-6108

² Kitami Institute of Technology, 165, Kouen-cho, Kitami-shi, Hokkaido 090-8507

³ Hokkaido Institute of Technology, 4-1, Maeda 7-15, Teine-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 006-8585

(Received 3 July 2002, Accepted 17 February 2003)

A metal-coated hollow-fiber membrane electrode (MCHE) has been applied as a working electrode of an electrochemical detector in high-performance liquid chromatography. In this paper, the structure of the detector was studied for obtaining a high sensitivity and sharp response on a model of electrochemical oxidation of glucose in an alkaline solution. The MCHE has a tubular structure with an inner volume that broadens the output signal peak with a wide distribution of the specimen concentration due to a residual sodium hydroxide solution. An analysis of the dead volume of the present detector revealed that the volume of holes in the membrane wall was almost equal to the inner volume of the electrode. Only the inside metal layer of the MCHE was made active for electrochemical detection in order to reduce the effect of the dead volume of the membrane holes. The detection limit and the half-width of the peak were down to 0.69 pmol and 1.8 s, respectively.

Keywords : metal coated hollow fiber membrane electrode; HPLC; electrochemical detector; amperometric detector; sugar sensor.

1 緒 言

糖鎖は、核酸やタンパク質よりもはるかに多くの生物学的

情報を担うことができる第3の分子生物学といわれている。DNAを語るときにアデニン、グアニン、シトシン、チミンが欠かせないように、糖鎖の場合もその糖の区別だけは最低必要である。すなわち、糖の単位は、炭素が6個つながった単糖で、グルコース、ガラクトース、フコース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、マンノースと炭素が9個つながったシアル酸といった7種類の基本単糖が糖鎖の単位である。そして、糖鎖の生物学的な特異性を決定している「言語」の中でそれぞれの単糖は、一つひとつの「文字」の役割を果たしている。しかし、糖鎖の組み合わせは指数関数的に膨大かつ複雑で

¹ 株式会社ニックス: 220-6108 神奈川県横浜市西区みなとみらい2-3-3

² 北見工業大学地域共同研究センター: 090-0013 北海道北見市柏陽町603-2

³ 北見工業大学工学部機能材料工学科: 090-8507 北海道北見市公園町165

⁴ 北見工業大学工学部化学システム工学科: 090-8507 北海道北見市公園町165

⁵ 北海道工業大学工学部福祉生体工学科: 006-8585 北海道札幌市手稲区前田7条15丁目4-1

多様化しているために、研究を困難なものにしている¹⁾。

生体内で極めて多様な役割を担っている糖質を解明する上で、微量な糖を検出することは重要で、より高感度な検出器が望まれている。糖類及びその関連物質に関する分析は、生化学、臨床化学、薬学、遺伝子工学及び糖鎖生物学などの様々な分野で研究が進められている。糖類の多くは、それ自身強い紫外吸収や光学的に検出できる発色基を持たないことから、未修飾の糖の検出は、示差屈折率検出器を用いる方法²⁾³⁾や紫外領域に吸収をもつソルビン酸塩などを用いる間接吸光検出法⁴⁾が一般的となっている。しかし、これらの方法は、いずれも感度及び選択性に問題があり、これらの問題を解決する手段として、糖類を誘導体化させ紫外吸光検出や蛍光検出するなどの試みがなされている⁵⁾⁶⁾。特に蛍光検出法は、高感度で選択性も良いが誘導体化させる操作が煩雑で、反応の収率の問題や試薬による汚染の問題が残されている。一方、糖類を誘導体化させずに直接検出する方法として、強アルカリ条件下で金属(Ni, Cu, Pt, Au)電極を用いて糖類を高感度に検出するものがある^{7)~11)}。これは電極が糖類の酸化反応に対して触媒的活性を示すことを利用して電気化学的に検出する方法である。

電気化学検出器の電極は、一般的に平面電極を使用するが、目的成分が低濃度となると測定精度が極端に低下するため高感度な電極が望まれている。そこで著者らは浄水器などに用いられている多孔質中空糸膜が極めて大きな表面積を有することに着目し、その表面に金属を被覆した導電性中空糸膜(metal coated hollow fiber membrane, MCH)を開発した¹²⁾。これは従来の膜がイオン伝導性の域にとどまっていたものを一歩進め、電子伝導性膜として機能させる新たな可能性を提案したものである。そして、この膜を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた電気化学検出器の電極として糖類を検出するセンサーへ応用する検討を行ってきた¹³⁾¹⁴⁾。この新たに開発された膜電極は、独自の袋構造ゆえに電極であると同時に検体の反応室の機能を兼ね備えている。したがって、構造が簡単で安価なセンサーを実用化することが可能である。また、微量な化学物質が金属被覆された多孔質中空糸膜の細孔を通過するごとに金属と接触することから反応効率が高く、高感度に検出できる新たな電極として期待されている¹⁴⁾。仮にこの電極が糖類の検出において極めて高い感度のセンサーとなれば、糖鎖を軸とするポストゲノム解析や漢方剤の薬理効果をモニタリングする生体分析などの糖鎖生物学の研究に大きく寄与することが可能となる。

本研究では、ポリプロピレン製中空糸膜に無電解めっき法を用いて銅を被覆した導電性中空糸膜¹²⁾をHPLCにおける電気化学検出器用作用電極として用い、糖類を検出する上で最も高感度かつシャープなピーク電流値が得られる

電極構造の検討を初めて行った。

2 実 験

2.1 試 薬

糖は、グルコース(和光純薬製特級)を用いた。電気化学検出に用いた各糖溶液は0.15 Mの水酸化ナトリウム溶液で、それぞれ目的濃度へ希釈した。

2.2 電極材料

本研究で使用した導電性中空糸膜は、ポリプロピレン製でアクゾ製S6/2タイプ(外径1.6 mm, 内径1.0 mm, 膜厚0.3 mm, 細孔径0.2~0.6 μm)に無電解めっき法を用いて銅を被覆したものである¹²⁾。この銅被覆表面には、腐食防止を目的にトップ防せい剤511(奥野製薬工業製)を用いて防せい処理を行った。なお、この際、防せい処理の有無に関して検量線及び再現性の相対標準偏差(RSD)の比較を行い、それぞれに差がないことの確認を行った。導電性中空糸膜の電子顕微鏡写真をFig. 1に示す。膜の形状は円筒状でポリプロピレン層と金属層(表面から数十μmの厚さ)から成っている。ここで、Fig. 1の(a)は断面写真である。(b)は断面部の拡大写真である。(c)は銅被覆部の拡大写真である。(d)は銅被覆する前のオリジナル写真である。実験では、この導電性中空糸膜をFig. 2のようにモジュール化した電極として使用した。電極に移動相を導入する際のテフロンチューブの内径は0.5 mmとした。

2.3 HPLC

実験に用いたフローセルの模式図をFig. 3に示す。開発したセル全体の材質は、強アルカリに対して耐性のあるビクトレックス・エムシー製のpoly ether ether ketone(PEEK)樹脂を使用した。ここで、HPLCにはDionex製AS7陰イオン交換カラムを組み込み、HPLCポンプには日立L-6010 pump, レコーダーには日立D-2500 Chromato-Integrator, 電気化学検出器として扶桑製作所製ポテンシオスタットHECS-321B, 作用電極に銅被覆した導電性中空糸膜電極, 参照電極に銀/塩化銀電極, 対極は白金コイルを使用した。0.45 μmのメンブランフィルターで汙過した0.15 Mの水酸化ナトリウム溶液を移動相として使用し、流量1 ml/minで送液した。空気中の二酸化炭素吸収を防ぐため、二酸化炭素吸収剤であるソーダライムを移動相溶液タンクに設置した。Fig. 3の各電極は、ポテンシオスタットに接続し、被覆された銅を酸化するのに十分な電極電位+0.55 Vに保ちながら¹⁴⁾グルコース溶液を注入し、電気化学的触媒反応に伴うグルコースの酸化反応を電流信号として計測した。

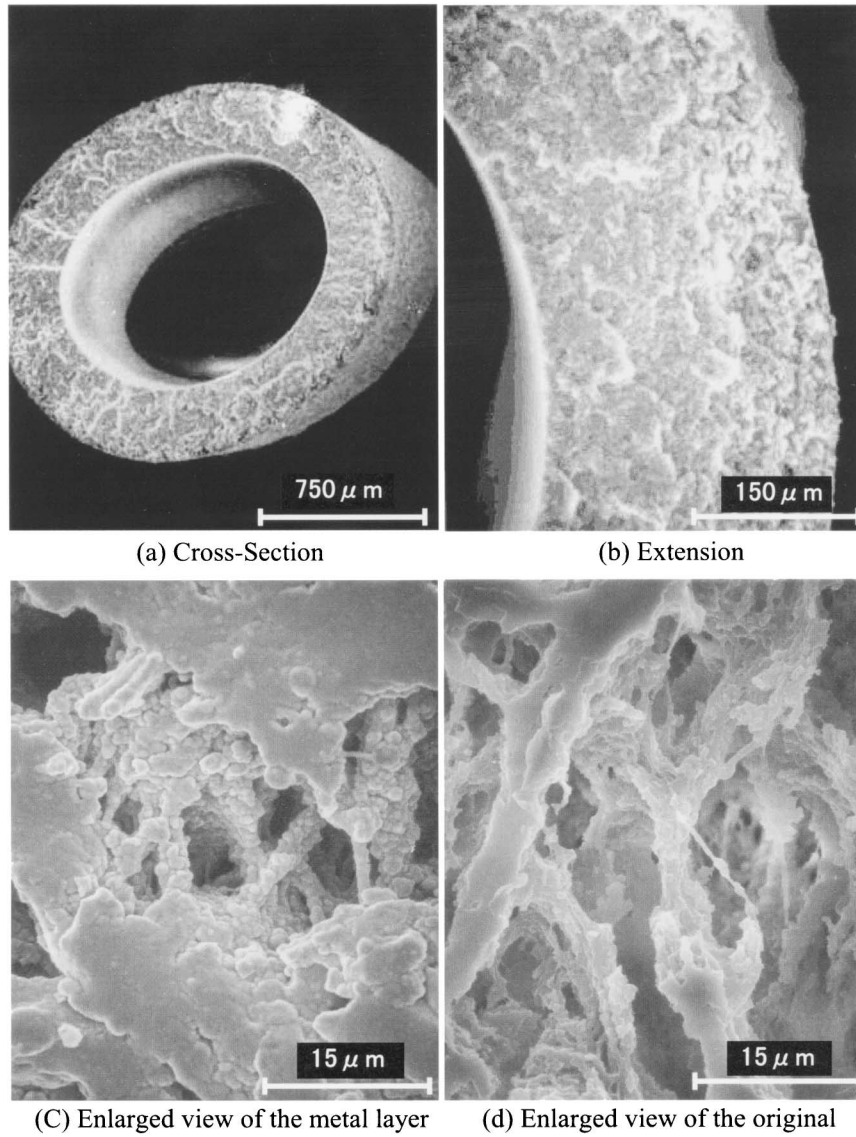


Fig. 1 SEM photographs of the metal coated hollow fiber membrane

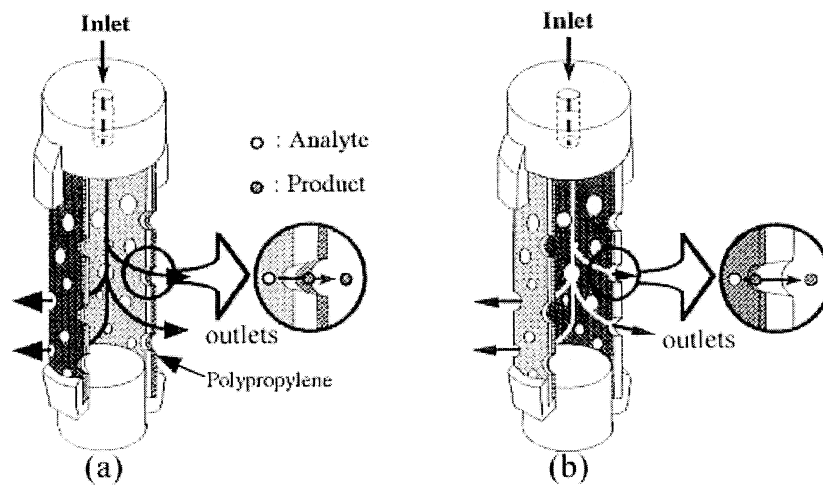


Fig. 2 Schematic representation of MCH electrodes plated (a) outside and (b) inside of wall in copper

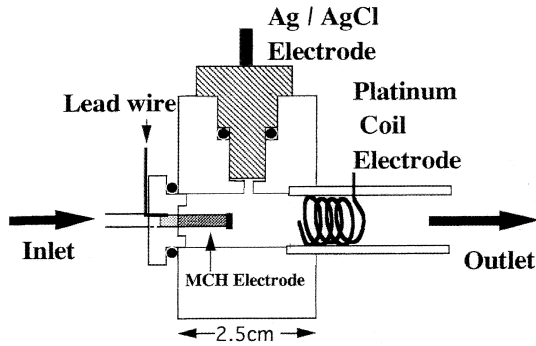


Fig. 3 Diagram of the flow cell assembly

3 結果と考察

3・1 膜電極内の残留水酸化ナトリウムの検討

従来の薄層型平面電極の層流は、常に溶液が押し出され移動相もしくは被検出物質が速やかに交換されながら電極表面と接している。一方、導電性中空糸膜電極は、特異な袋構造であると同時に内径 0.5 mm のテフロンチューブから送液された移動相もしくは、被検出物質が内径 1.0 mm の膜電極に送液されることから乱流が生じてしまう。また、被検出物質が電極内部で待ち受けている残留水酸化ナトリウムと混合することによって見掛け上、糖濃度の低下が起こり感度の低下を招いている。以上の送液システムを分かりやすくするために擬似的な直線概念図を Fig. 4 に示す。Fig. 4 において試料が送液されると、残留水酸化ナトリウムによって試料濃度分布がそれぞれ変化する。具体的には、実験に用いられる糖溶液が、テフロンチューブから膜電極に送液された段階で濃度分布は反応室に存在する水酸化ナトリウムにより幅広くなる。次に細孔部を通過する時点でも細孔部に存在する水酸化ナトリウムにより濃度分布は更に幅広くなり、電気信号のピーク幅がブロードになると考えている。このことから膜電極内の残留水酸化ナト

リウム量（デッドボリューム）をいかに少なくするかが重要である。デッドボリュームの低減においては、反応室の容量だけではなく膜細孔部の空孔容量も重要で、以下に検討を行った。

膜電極長を L として実験に用いた内径 1.0 mm の膜電極の反応室容量を算出すると $0.25 \pi L \text{ mm}^2$ である。これに対して膜部分の容量は、膜厚を 0.3 mm として計算すると $0.39 \pi L \text{ mm}^2$ である。また、多孔質中空糸膜の空孔率は 70%、被覆した金属が占める割合はめっき条件によっても異なるが、仮に 6% とすると、実質的空孔率は 64% で膜電極細孔部のデッドボリュームは約 $0.25 \pi L \text{ mm}^2$ となり、反応室とほぼ同容量となる。したがって、従来、外壁めっきによる導電性中空糸膜電極を用いて糖の検出¹³⁾¹⁴⁾を行ってきたが、残留水酸化ナトリウムによる糖の希釈は、膜電極の反応室だけではなく細孔部でも起こっており、ピーク電流波形を更にブロード化する原因と推察される。そこで、外壁めっきから内壁めっきに変え、細孔部容量で起こる残留水酸化ナトリウムの希釈の影響を排除し、細孔部を通過する直前で糖検出することを試みた。

3・1・1 外壁銅被覆と内壁銅被覆電極との応答比較

外壁に銅を被覆した導電性中空糸膜電極と内壁に銅を被覆した導電性中空糸膜電極を Fig. 2 に示すように 2 種類用意し、それぞれの電極長さを 7 mm に統一し、細孔部デッドボリュームの影響を評価した。グルコース濃度を 100 μM に設定し 20 μl 注入した際のピーク電流値、ノイズ、検出限界値及び半値幅の応答比較を行った結果を Table 1 に示す。また、得られた出力波形を Fig. 5 に示す。ピーク電流値は、外壁銅被覆で 90.3 μA に対して内壁銅被覆では 99.3 μA であった。また、ノイズは外壁銅被覆で 25.6 nA に対して内壁銅被覆では 20 nA であった。検出限界値は $S/N=3$ として、外壁銅被覆 1.7 pmol に対して内壁銅被覆では 1.2 pmol となり、約 30% 下げることが可能となった。一番顕著な効果は半値幅に現れ、外壁銅被覆では

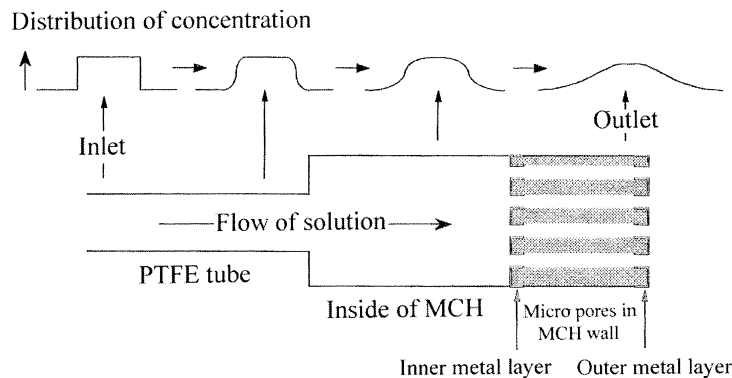


Fig. 4 Schematic representation of concentration distribution with the flow through MCH electrode

Table 1 Comparison of performances of MCH electrode plated inside or outside of mambrane as electrochemical detector

	Plated outside	Plated inside
Peak current/ μA	90.3	99.3
Noise/nA	25.6	20.0
Half-width/s	10.2	3.6
Detection limit/pmol	1.7	1.2

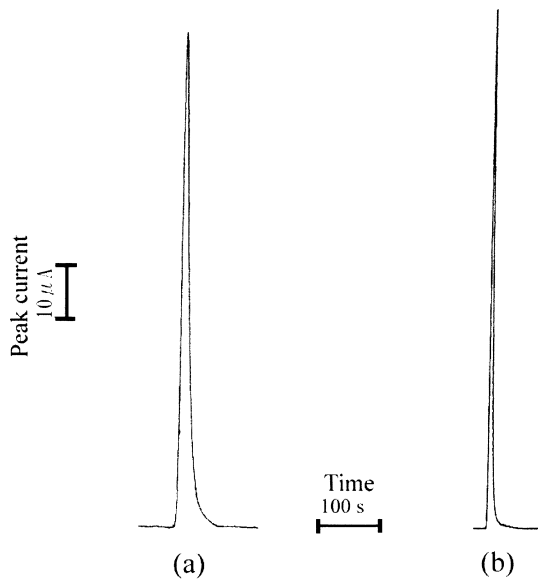


Fig. 5 Chromatograms of glucose detected with MCH electrode plated (a) outside and (b) inside of wall

10.2 秒であったのに対して内壁銅被覆では 3.6 秒となり、約 1/3 に短縮された。導電性中空糸膜電極は、従来電極に比べて極めて大きな表面積を有することから、大きな電流信号が得られるが、ピーク幅がブロードとなりシャープな波形が求められていた¹⁴⁾。これは、半値幅が広いと検体の多成分同時分析の場合に、分離された成分のピークが接近して重なり合い判別しにくくなるためである。しかし、今回の内壁めっきの変更によって糖類を細孔部の通過初期段階で検知することで、糖溶液濃度の低下を抑え、ピーク波形のシャープ化ができたと考えている。

3・1・2 内壁銅被覆電極長と応答特性 内壁銅被覆導電性中空糸膜電極を使用した際の膜電極長とピーク電流値、ノイズ、半値幅及び検出限界値を測定し、適正電極長の見極めを行った。導電性中空糸膜の電極長を 1, 2, 4, 7, 10 mm と変化させ、グルコース濃度を 100 μM に設定し 20 μl 注入した際の応答挙動の結果を Fig. 6 に示す。ピーク電流値は電極長が 7 mm のときに最大の 99.3 μA を示し、その後減少した。これは電極が長くなるに従って反応面積が増大し、ピーク電流値は上昇するが、同時に反応室

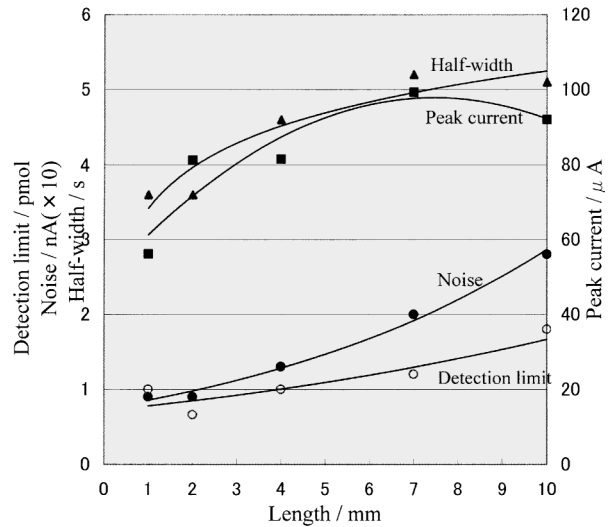


Fig. 6 Effect of length of MCH electrode plated outside of wall on the electrochemical response

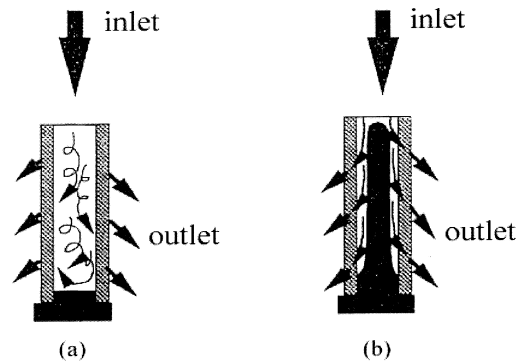


Fig. 7 Schematic representation of flow through MCH electrode filled (a) without (b) with plug

容量も増大し、残留水酸化ナトリウムによってグルコースの希釈が生じたためである。また、ノイズは電極長が 1~2 mm のとき 9 nA で最小値を示し、その後、電極長に比例して増加した。検出限界値は $S/N=3$ としたとき、電極長が 2 mm のときに最小で 0.66 pmol を示したが、その後、電極長の増加とともにノイズも増加し、検出限界値は電極長が 10 mm で 1.8 pmol と上昇した。このことから、最適電極長は 2 mm が望ましいが、電極製作上の難易度を配慮すると 7 mm 前後の長さが適正と考えられる。

3・1・3 膜電極中のプラグによる効果 次に、膜電極内部に Fig. 7 に示すプラグを取り付け、反応室の容量を微小化して希釈効果を防止し、更なる高感度検出を試みた。検出条件を 3・1・1 と同様に設定し、プラグを装着した電極の長さを 2, 4, 10 mm に変化させて得られた応答特性を Fig. 8 に示す。プラグが無い場合は、電極長が 7 mm でピーク電流値が最大を示し、その後低下したが、プラグが有る場合は、ピーク電流値は飽和することなく電極

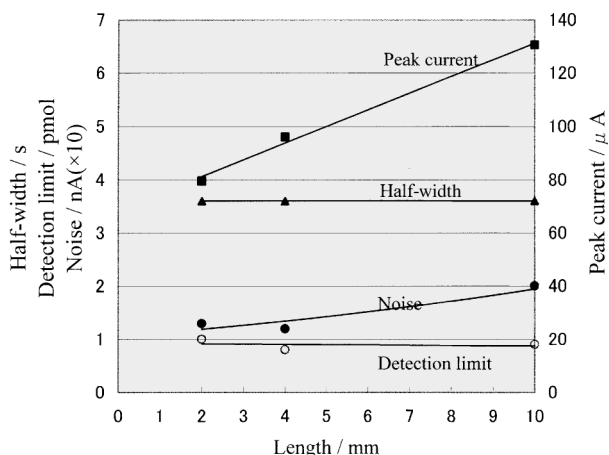


Fig. 8 Effect of length MCH electrode filled with the plug on the electrochemical response

長の増加に比例して上昇した。これは電極内部に設けたプラグにより反応室のデッドボリュームが微小化され、テフロンチューブ断面に近似させたことで電極長さを増加しても残留水酸化ナトリウムによるグルコースの希釈効果が緩和されたためと考えられる。これは電極が長いほどプラグの効果が明らかであり、電極長 10 mm のときに得られたピーク電流値は、プラグが無い状態で $95.4 \mu\text{A}$ に対してプラグが有ると $130.7 \mu\text{A}$ となり、検出限界値は 1.8 pmol に対して 0.9 pmol と高感度化が達成された。また、プラグの効果はピークの半値幅に最も顕著な効果を示している。プラグの無い場合は電極の長さに伴って半値幅が増大していたが、プラグを組み込んだ場合、電極長にかかわらず 3.6 秒と一定の値であった。これは、カラムにおいて分離された目的物質が、電極表面に到達するまでの間に受ける拡散や対流の影響を最小限にとどめることができたことを示している。HPLC 用検出器ではカラムにおける分離特性を損なうことなく目的物質を検出できることは重要であり、導電性中空糸膜の応用を考える際、プラグによる電極内部のデッドボリュームの微小化が有効であることを明らかにした。更に、この結果から内径のより小さな中空糸膜が HPLC 用電気化学検出器を構築する場合に有効であることも示唆された。

3.2 膜電極内・外壁部の電氣的絶縁性の検討

内壁金属被覆膜電極は、膜厚部の残留水酸化ナトリウムを排除し、インサートしたプラグは、反応室部の残留水酸化ナトリウムを排除するのに有効であった。そこで、更に感度を上げるために、内壁めっきにおける以下の検討を行った。

一般的に無電解めっきは、金属との結合を強めるためにエッチング工程が必要であるが、この工程が省略されても

Table 2 Effect of insulator between the inner and outer metal layer of MCH on the electrochemical response

	Not insulated	Insulated
Peak current/ μA	108.6	108.4
Noise/nA	54.0	25.0
Half-width/s	3.0	1.8
Detection limit/ pmol	1.49	0.69

ある程度のめっきを表面に形成することができる。したがって、膜電極内壁だけをめっきすることは難しく、外壁にもめっきが薄く付いてしまう。この対策としてマスキングを行うが、多孔質中空糸膜の場合、細孔部までマスキング溶液が入り込んでしまうため、それを取り除く方法が極めて難しい。また、膜全体をマスキングし、はく離させる工程は電極コストにも大きく影響を与えてしまうため好ましくない。

また、膜電極の出力を高めるために細孔部のめっき深度を上げ反応面積の拡大を図るが、めっきを深めることで外壁に形成されためっき部と部分的に導通してしまうことがある。

更に、膜が薄いことから膜の内壁面からリード線を取り出す際に内・外壁が接触し短絡を起こす可能性がある。したがって、内壁金属被覆膜電極を用いて高感度化させるには、これらの構造的な不確定要因を取り除く必要がある。

内・外壁の導通干渉は、内壁銅被覆部で未反応の糖が、外壁銅被覆部と反応してしまいピーク部がブロード化する。また、その一部はノイズとなって現れてしまうことから、結果として高感度な検出を妨げていると考えられる。そこで、内壁と外壁に明確な絶縁層を作るためのめっき条件を設定し、なおかつ膜電極製作時に内壁面単独から電気信号が取り出せるように、外壁の一部をマスキングして絶縁化し、リード線による内・外壁の短絡を防止した膜電極にて実験を行った。

電極長を 7 mm とし、グルコース濃度を $50 \mu\text{M}$ に設定し $20 \mu\text{l}$ 注入したときのマスキング有無の実験結果を Table 2 に示す。ピーク電流値は、マスキングがない場合は $108.6 \mu\text{A}$ で、マスキングがある場合は $108.4 \mu\text{A}$ でほぼ同じ値であった。しかし、ノイズはマスキングがない場合で 54 nA だったものが、マスキングをすることによって 25 nA に半減した。このことから検出限界値は $S/N=3$ として 1.49 pmol から 0.69 pmol となり、感度を一けた上げることができた。また、半値幅はマスキングがない場合で 3.0 秒であったものが、マスキングをすることによって 1.8 秒となり約 1/2 となった。

以上のことから、内壁金属被覆膜電極の外壁部との絶縁をより積極的に行うことで更に高感度で半値幅の狭いシャ

ープなピーク波形が得られることを示した。

終わりに、本研究に当たって糖に関する高感度検出のご指導をいただいた北里大学大学院感染制御科学府の山田陽城教授、清原寛章助教授に感謝します。また、HPLC に関してご指導いただいた東京理科大学薬学部の中村 洋教授に感謝します。

文 献

- 1) N. Sharon, H. Lis: *Scientific American*, (1993).
- 2) A. E. Bruno, B. Krattiger, F. Mayster, H. M. Widmer: *Anal. Chem.*, **63**, 2689 (1991).
- 3) B. Krattiger, G. J. M. Bruin, A. E. Bruno: *Anal. Chem.*, **66**, 1 (1994).
- 4) A. Klockow, A. Paulus, V. Figueiredo, R. Amado, H. M. Widmer: *J. Chromatogr. A*, **680**, 187 (1994).
- 5) A. Klockow, R. Amado, H. M. Widmer, A. Paulus: *J. Chromatogr. A*, **716**, 241 (1995).
- 6) N. Kiba, K. Saegusa, M. Furusawa: *J. Chromatogr. B*, **689**, 393 (1997).
- 7) D. C. Johnson, W. R. LaCourse: *Anal. Chem.*, **62**, 589A (1990).
- 8) I. G. Casella, T. R. I. Cataldi, A. M. Salvi, E. Desimoni: *Anal. Chem.*, **65**, 3143 (1993).
- 9) M. B. Jensen, D. C. Johnson: *Anal. Chem.*, **69**, 1776 (1997).
- 10) P. Singhal, K. T. Kawagoe, C. N. Christian, W. G. Kuhr: *Anal. Chem.*, **69**, 1662 (1997).
- 11) Z. L. Chen, D. B. J. Hibbert: *J. Chromatogr. A*, **766**, 27 (1997).
- 12) M. Sano, N. Katsuura, O. Igarashi, A. Nakayana, T. Imamura, K. Kadotani: U.S. patent, 5510195 (1992. 2.27).
- 13) M. Uto, K. Kodama, K. Ishimori, Y. Kudo, S. Hoshi, M. Matsubara: *Anal. Sci.*, **10**, 835 (1994).
- 14) 五十嵐 治, 宇都正幸, 井上貞信, 星 座, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二: 膜学会論文誌, **27**, 145 (2002).

要 旨

HPLC における電気化学検出器の作用電極として、導電性中空糸膜を応用することを試みた。アルカリ溶液中での糖の電気化学的酸化をモデルに高感度かつシャープなピーク電流値が得られる電極構造の検討を行った。導電性中空糸膜電極は反応室を兼ね備えた特異な袋構造のために、残留移動相によって試料成分が希釈され、出力信号のピークがブロードになる。導電性中空糸膜電極中の残留水酸化ナトリウム量を検討した結果、反応室だけではなく膜自身の細孔部の空孔容量も反応室とほぼ同容量で無視できないことが分かった。そこで、膜細孔部のデッドボリュームを低減するため中空糸膜への金属被覆を外壁のみから内壁へ変更した。その結果、検出限界値 ($S/N=3$) は、外壁金属被覆より 30% 向上し 1.2 pmol となった。また、ピーク半値幅は 1/3 に短縮され 3.6 秒となった。次に内壁に被覆した金属のみが応答に寄与する構造を考案した。その結果、ノイズが 54 nA から 25 nA に半減し、検出限界値 ($S/N=3$) は 0.69 pmol, 半値幅は 1.8 秒とほぼ半減した。以上のことから、従来の外壁金属被覆導電性中空糸膜電極と比べると検出限界値は約 1/3 に下がり、半値幅は約 1/6 と大幅に短縮され、高感度でシャープなピーク電流が得られた。