

# キチン-キトサン膜被覆電極を用いた ジヒドロキシベンゼンのボルタンメトリーの挙動†

菅原一晴\*, 高橋哲史\*\*

## Voltammetric behavior of dihydroxybenzene using a glassy carbon electrode covered with chitin-chitosan film†

Kazuharu Sugawara\* and Tetsushi Takahashi\*\*

In the present study, we constructed a glassy carbon electrode covered with a biocompatible chitin-chitosan film that can modify functional substance. A carbon powder and a ferrocene were introduced into the composite film as the substances. The carbon powder improved the conductivity of the film, and the ferrocene had the function of an electron mediator. The ferrocene moieties were bound to the composite film using Schiff base between amino groups of the chitosan and ferrocenecarboxaldehyde. To examine the behavior of the ferrocene/carbon powder chitin-chitosan film, an electroactive dihydroxybenzene was selected. Dihydroxybenzene has three structural isomers, and the isomers are called pyrocatechol, resorcinol, and hydroquinone. Each electrode response differed, due to the difference of the permeability to the chitin-chitosan film. As a result, the responses of pyrocatechol were particularly improved. Therefore, the electrode constructed could contribute to measure catechol amines such as dopamine and adrenaline that are significant within organisms.

**Key words** : Chitin, Chitosan, Glassy carbon electrode, Dihydroxybenzene

### 1 はじめに

キチンとは *N*-アセチル-D-グルコサミンが $\beta$ -1-4 結合で重合した物質である。エビやカニのような甲殻類の殻や、キノコのような菌類の細胞壁の成分として自然界に広く存在し、バイオマス材料として利用されている<sup>1)</sup>。キチンは分子内においても、分子間においても水素結合を形成しているため化学的に安定性が高く、ほとんどの溶媒に対して不溶・不活性である<sup>2)</sup>。また、生体内においてキチナーゼやリゾチームによって分解されたり、食物繊維として機能したりするため生体適合性も高く、生体分子を反応させるための支持体として有用である<sup>3)</sup>。一方、キトサンとは、キチンに熱濃アルカリを用いて脱アセチル化し、キチンの *N*-アセチル基が脱アセチル化された物質である。キトサンはキトサンの持つアミノ基に共有結合で機能性分子を修飾することで選択性や導電性の向上といった機能をもたせることができる。メタクリル酸グリシジルを修飾した複合材料の利用<sup>4)</sup>や、液相における不均一触媒中での応用<sup>5)</sup>、糖質やシクロデキストリン、クラウンエーテル等の分子を修飾した例が報告さ

れている<sup>6)</sup>。これまでに著者らは、キチン膜に wheat germ agglutinin を修飾し、*N*-アセチルグルコサミンのセンシングを行い<sup>7)</sup>、キチン膜中にカーボンパウダーを複合して膜全体の伝導性を向上させている<sup>8)</sup>。また、生体高分子膜に電子伝達媒体を添加することで生体膜に新たな機能性をもたせることができる。例えば、生体高分子表面に電子伝達媒体を修飾することで目的物質と電極表面の電子伝達を促進させる手法がある。キトサンなどの膜に導入する電子伝達媒体として使用されているものとして、アズール色素<sup>9)</sup>や、チオニン<sup>10)</sup>を使ったものが報告されている。特に広く用いられている電子伝達媒体は、フェロセンであり鉄(II)イオンが二つのシクロペンタジエニル環と配位結合したサンドイッチ構造をもつ。フェロセンは、二つのシクロペンタジエニル環から電子をひとつずつ受け取り、フェロセンは安定した電子構造をとる。そのためフェロセンは加水分解や熱分解に安定である。フェロセンはフェリシニウムイオンと酸化還元対を成し、酸化に対しても安定である。例えば、グルコースオキシダーゼにフェロセンカルボン酸を修飾したグ

† 原稿受理 平成27年2月27日 Received February 27, 2015

\* 教職センター(Teaching Profession Center)

\*\* 群馬大学教育学部(Faculty of education, Gunma University)

ルコースのバイオセンサや<sup>11)</sup>、フェロセニウムイオンとの相互作用による Dengue 熱ウイルス由来のオリゴヌクレオチドの電気化学的検出が報告されている<sup>12)</sup>。

本研究では、機能性分子が修飾可能で生体適合性を有するキチン-キトサン複合材料の作製を試みた。機能性材料としてカーボンパウダーそしてフェロセンを導入した機能性膜を考案した。フェロセンに CHO 部位を有するフェロセンカルボキシアルデヒドを用いることが考えられる。キチン-キトサン複合膜中への修飾はキトサンのアミノ基と CHO 基との Schiff 塩基反応に基づいた手法を取ることができる (Fig. 1)。それによってフェロセンの電子伝達媒体としての機能によってキチン-キトサン膜の表面の電子伝達能を増加させることができると考えられる。作製した複合膜の性能を評価する指標としてジヒドロキシベンゼンを選択した。ジヒドロキシベンゼンとはベンゼン環のうち二つの水素がヒドロキシル基に置換されたものであり、ピロカテコールとレソルシノール、ヒドロキノンの3つの構造異性体が存在する。その中で、ピロカテコールは、アドレナリンやドーパミンといったカテコールアミンのような生体分子の骨格として存在し神経伝達機能をもつ分子であるため電気化学的挙動を考察する上で基礎的研究になりうる。それゆえ、グラッシーカーボン電極をカーボンパウダー-キチン-キトサン複合膜あるいはフェロセン/カーボンパウダー-キチン-キトサン複合膜で被覆してジヒドロキシベンゼンの酸化還元応答を測定した。

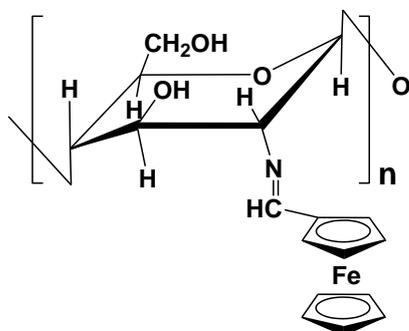


Fig. 1 Chitosan modified with ferrocene

## 2 実験

### 2.1 測定装置

全ての電気化学的測定を行うにあたっては、ALS Instrument Electrochemical Analyzer Model 822BD を使用した。作用電極には、グラッシーカーボン電極を用いた。参照電極は、Ag/AgCl 電極、対極は白金線であった。

### 2.2 試薬

カーボンパウダーは東海カーボン(株)製から購入した。キチン(K-02)はフナコシ(株)社であった。キトサン、塩化リチウム *N,N*-ジメチルアセトアミド(DMA)、1-メチル-2-ピロリドン(NMP)、ピロカテコール、レソルシ

ノール、ヒドロキノンは和光純薬工業(株)製のものを使用した。他の試薬は分析用試薬であった。

### 2.3 キチン-キトサン膜の作製

DMA 1.6 g, NMP 1.6 g を入れマグネティックスターラーで攪拌して塩化リチウム 0.25 g を溶解した。その溶液にキチンを 0.072 g 加え、ゲル状になるまで攪拌した。作製する膜に合わせてキチン-キトサン膜では、キトサンを 0.018 g を添加した。フェロセン/キチン-キトサン膜の作製にあたってはキトサン 0.018 g, フェロセン 0.002 g, カーボンパウダー-キチン-キトサン膜に関しては、キトサン 0.018 g, カーボンパウダー-0.0375 g を秤取った。フェロセン/カーボンパウダー-キチン-キトサン膜においてはキトサン 0.018 g, カーボンパウダー-0.0375 g, フェロセン 0.002 g をそれぞれ加えた。ゲル状になったら、さらに DMA と NMP を 3.2 g ずつ加え攪拌を続けた。そして粘性が高まったら 1 つのシャーレに各溶液を 1.5 g ずつ入れて乾燥器で 24 時間減圧乾燥し、乾燥器からとりだして放冷後、蒸留水で 5 回洗浄を行った。その後、使用するまで冷蔵庫で作製した膜を保存した。

### 2.4 キチン-キトサン膜被覆電極の作製

グラッシーカーボン電極は測定ごとに電極表面を粒径がアルミナ 1.0, 0.05  $\mu\text{m}$  (Baikowski International Coap., Charlotte, NC) をそれぞれ用いてマイクロクロス (40-7240 Buehler LTD. USA) 上で研磨した。引き続き、グラッシーカーボン電極を作製したキチン-キトサン膜で被覆し、O-リングで膜を固定した。

### 2.5 測定方法

リン酸二水素カリウム (0.1 M) と水酸化ナトリウム (0.1 M) とを混合した pH 5.6 のリン酸緩衝溶液を用いて電極活性物質としてピロカテコール、レソルシノール、ヒドロキノンを  $5 \times 10^{-4}$  M の溶液を加え、マグネティックスターラーで 20 分攪拌しサイクリックボルタンメトリ (掃引速度 50 mV/s) により測定した。

## 3 結果と考察

### 3.1 キチン-キトサン複合膜の評価

Fig. 2 にキチン-キトサン膜で被覆したグラッシーカーボン電極で得られたピロカテコールの酸化還元応答を示す。酸化電位は、0.56 V であり還元電位は -0.01 V となった。複合膜で被覆しない場合の応答では、0.38 V と 0.11 V を示した。膜で電極を被覆した場合にはそれぞれ電極応答は、酸化電流は 70%、還元は 30% 程度までに電流値が減少した。このようにキチン-キトサン膜を被覆したことで酸化還元の可逆性の低下と電流値の減少が認められた。これらの現状を改善するために、フェロセン誘導体を含む複合膜を作製した。その結果、酸化電位は 0.48 V、還元電位は -0.05 V となり、電流値もキチン-キトサン膜のないときに比べ、酸化電流値が 79%、還元電流値が 44% になった。それゆえ、フェロセンをキトサンに修飾してキチンとの複合膜に加えた中でも、フェロセンが電子伝達媒体として機能していることが推察できる。

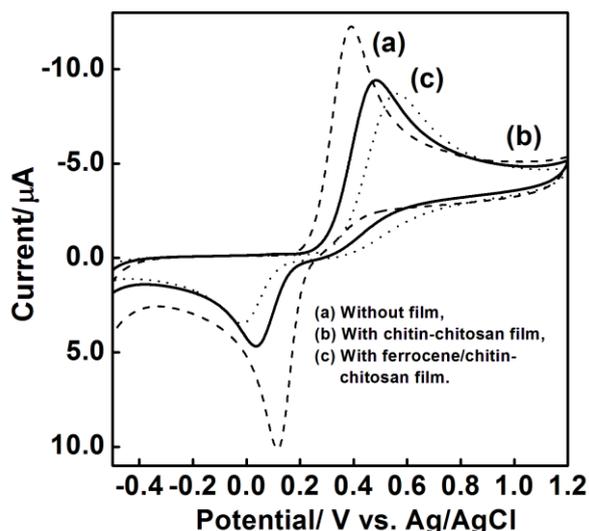


Fig. 2 Voltammograms of pyrocatechol using a glassy carbon electrode covered with ferrocene/chitin-chitosan film

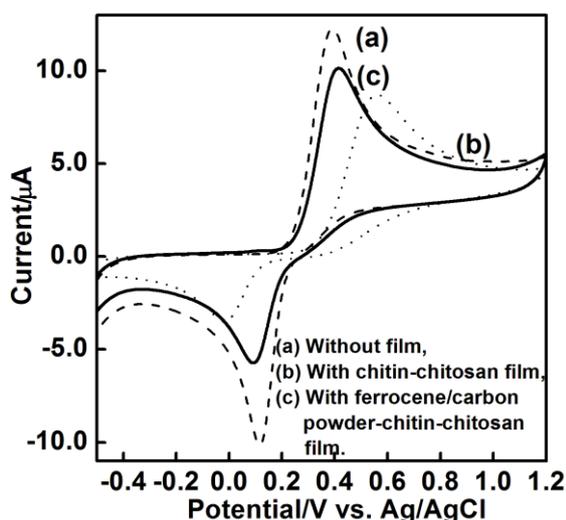


Fig. 3 Voltammograms of pyrocatechol using a glassy carbon electrode covered with carbon powder-chitin-chitosan film

一方で、熱分解カーボン粉末を添加したキチン-キトサン複合膜も調製した。測定の結果、酸化電位は 0.45 V、還元電位は 0.05 V にシフトし、電流値も未被覆電極に比べ酸化電流値が 82%、還元電流値が 38% になった (Fig. 3)。フェロセンよりカーボンパウダーを含む複合膜で被覆した電極のほうが高い電極反応の可逆性と酸化電流値が得られた。

フェロセン/カーボンパウダー-キチン-キトサン膜では酸化電位が 0.41 V、還元電位が 0.05 V であり、酸化電流値が 83% と還元電流値が 55% に向上した (Fig. 4)。それゆえ、フェロセンとカーボンパウダーの両方を加えることで、より良い酸化還元反応の可逆性とピーク電流値を改善できることが見出された。

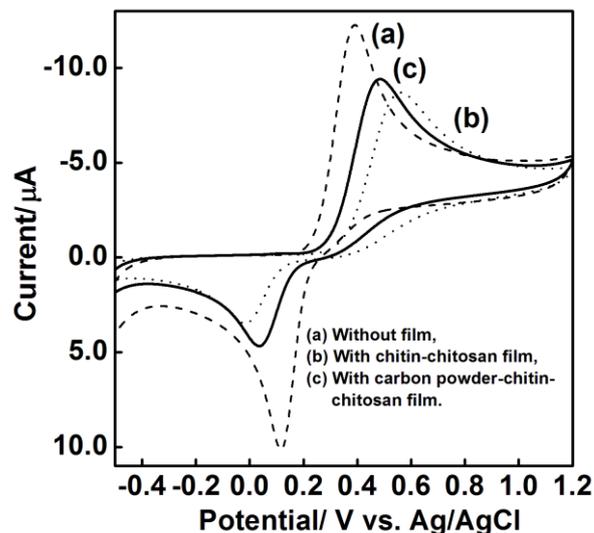


Fig. 4 Voltammograms of pyrocatechol using a glassy carbon electrode covered with ferrocene/carbon powder-chitin-chitosan film

### 3・2 レソルシノールの電極応答の検討

未被覆の電極でのレソルシノールの酸化波は、ピロカテコールよりも大きい電流値が観測されたが、還元電流値は観測されなかった (Fig. 5)。これはレソルシノールの構造から起因する不安定性によることが予想される<sup>13)</sup>。フェロセン/カーボンパウダー-キチン-キトサン膜で被覆した電極を用いて測定を行ったところ、未被覆の電極で得られた電流値とほぼ同等の値が得られていることから、複合膜の効果が高いものと考えられる。

### 3・3 ヒドロキノンの電極応答の検討

ヒドロキノンの測定では、ピロカテコールと類似したボルタモグラムが得られた (Fig. 6)。複合膜未被覆時における酸化電位が 0.35 V、還元電位が -0.03 V であった。キチン-キトサン膜電極での酸化還元電位は、それぞれ 0.42 V、0.10 V となり可逆性が低下した。一方で、電流値は、78% と 70% になった。フェロセン/カーボンパウダー-キチン-キトサン膜で被覆した電極を用いると酸化波においては、数パーセントの改善が確認された。その点からヒドロキノンは電子伝達能がピロカテコールより安定していることがわかる。

## 4 まとめ

本研究では、生体分子の足場となるキチン-キトサン膜を被覆したことによっておこる電極応答の低下を、導電性の高いカーボンパウダーや電子伝達媒体の機能を有するフェロセン誘導体を修飾することで、ジヒドロキシベンゼンの電極応答の改善をはかることができた。特にピロカテコールにおいて、酸化電流値が 11%、還元電流値を 25% 改善することができた。カーボンパウダーやフェロセン誘導体のみを含むキチン-キトサン膜において

参考文献

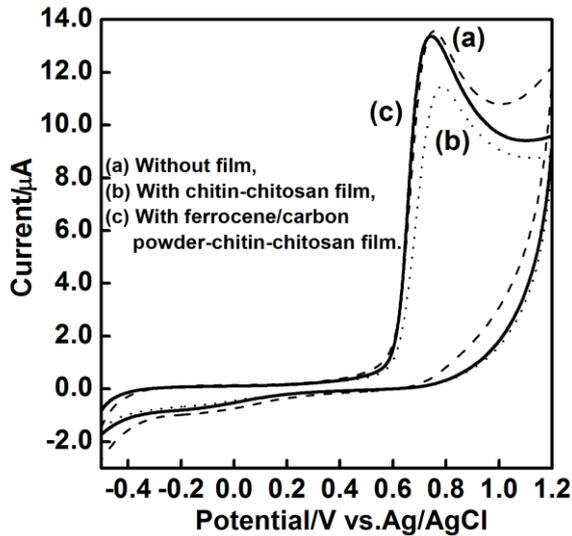


Fig. 5 Voltammograms of Resorinol using a glassy carbon electrode covered with ferrocene/carbon powder-chitin-chitosan film

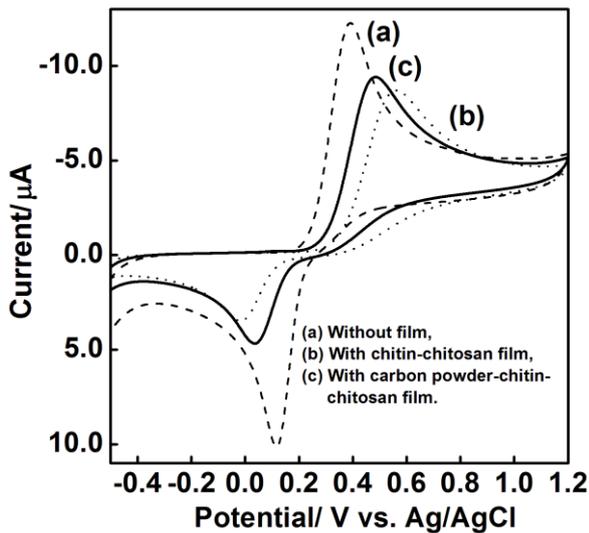


Fig. 6 Voltammograms of hydroquinone using a glassy carbon electrode covered with ferrocene/carbon powder-chitin-chitosan film

も電極応答は改善されるが、カーボンパウダーを含有しフェロセン誘導体で修飾したキチン-キトサン膜を用いることでよりよい電極応答のいっそうの改善が見られた。ジヒドロキシベンゼンに関して、提案された電極は神経伝達物質であるドーパミンやアドレナリンのようなカテコールアミンの酸化還元応答の測定に応用でき、生体適合性の高いバイオセンサとなることが期待される。

- 1) M.N.V Ravi Kumar, *React. Functional Polymers*, 46, 1 (2000).
- 2) B. Krajewska, *Enzyme Microb. Tech.* 35, 126 (2004).
- 3) R. Jayakumar, D. Menon, K. Manzoor, S.V. Nair and H. Tamura, *Carbohydr. Polym.* 82, 227 (2010).
- 4) N. Flores-Ramírez, E.A. Elizalde-Peña, S.R. Vásquez-García, J. González-Hernández, A. Martínez-Ruvalcaba, I.C. Sanchez, G. Luna-Bárceñas and R.B. Gupta, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 16, 473 (2005).
- 5) D.J. Macquarrie and J.J.E. Hardy, *Chem. Res.* 44, 8499 (2005).
- 6) H. Sashiwa, S. Aiba, *Prog. Polym. Sci.* 29, 887 (2004).
- 7) K. Sugawara, T. Takayanagi, N. Kamiya, G. Hirabayashi and H. Kuramitz, *Talanta* 71, 1637 (2007).
- 8) K. Sugawara, M. Kawai, G. Hirabayashi and H. Kuramitz, *Anal. Sci.* 25, 105 (2009).
- 9) M. Zhang, and W. Gorski, *Anal. Chem.* 77, 3960 (2005).
- 10) M. Yang, Y. Yang, Y. Yang, G. Shen and R. Yu, *Anal. Biochem.* 334, 127 (2004).
- 11) X. Chen, J. Jia and S. Dong, *Electroanalysis* 15, 608 (2003).
- 12) F.R.R. Teles, D.M.F. Prazeres and J.L.L. Filho, *Sensors* 7, 2510 (2007).
- 13) B. Nasr, G. Abdellatif, P. Canizares, C. Saez, J. Lobato and M. A. Rodrigo, *Environ. Sci. Technol.* 39, 7234 (2005)