

# **Cu<sub>2</sub>O/CuO ナノシートのペルオキシダーゼ様活性を利用したグルコース定量法**

令和3年度  
三重大学大学院 工学研究科  
博士前期課程 分子素材工学専攻  
生物機能工学講座  
研究領域 F: 先進物質・先進材料  
分析環境化学研究室

420M354 横井 嶺

## 目次

第 1 章	序論.....	3
1-1	グルコース定量法.....	3
1-2	過酸化水素.....	4
1-3	酸化銅.....	5
1-3-1	ソフトテンプレートを用いた合成法.....	5
1-3-2	Cu <sub>2</sub> O の存在の有用性.....	6
1-4	<i>o</i> -phenylenediamine.....	7
1-5	蛍光分析法.....	8
1-6	本研究の目的.....	9
第 2 章	実験.....	10
2-1	使用器具.....	10
2-2	分析機器.....	10
2-3	実験試薬.....	10
2-4	実験操作.....	11
2-4-1	Cu <sub>2</sub> O/CuO の調製方法.....	11
2-4-2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 検出の実験手順.....	12
2-4-3	Coumarin によるヒドロキシラジカルの捕捉実験の手順.....	13
2-4-4	グルコース検出の実験手順.....	14
2-4-5	速度論的分析の実験手順.....	15
2-4-6	速度論的定数(K <sub>m</sub> と V <sub>max</sub> )の導出.....	16
第 3 章	Cu <sub>2</sub> O/CuO の合成.....	17
3-1	Cu <sub>2</sub> O/CuO の合成条件の最適化.....	17
3-1-1	Cu <sub>2</sub> O/CuO と他の条件との比較.....	18
3-1-2	市販品の Cu <sub>2</sub> O (Aldrich) と CuO (Aldrich) を混合したときの活性.....	19
3-2	Cu <sub>2</sub> O/CuO の特性評価.....	20

3-2-1 XRD .....	20
3-2-2 SEM.....	22
3-2-3 TEM .....	25
3-2-4 XPS .....	28
3-2-5 BET 法 .....	30
3-2-6 Cu <sub>2</sub> O/CuO ナノシートの合成メカニズム .....	35
第4章 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 定量.....	36
4-1 pH 条件の最適化.....	36
4-2 系内の触媒濃度の最適化.....	37
4-3 過酸化水素の検量線.....	38
4-4 結果の比較.....	39
4-5 クマリン(Coumarin)によるラジカル捕捉実験 .....	40
第5章 グルコース定量.....	41
5-1 グルコースオキシダーゼ (GOD) の濃度 (U/mL) の最適化.....	41
5-2 グルコースの検量線.....	42
5-3 結果の比較.....	43
5-4 実試料の測定.....	44
第6章 速度論的分析.....	45
6-1 西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)の速度論的分析 .....	45
6-2 Cu <sub>2</sub> O/CuO の速度論的分析 .....	47
6-3 HRP と Cu <sub>2</sub> O/CuO の速度論的分析結果の比較 .....	49
第7章 結論.....	50
参考文献	51
学会発表	53
謝辞	54

## 第1章 序論

### 1-1 グルコース定量法

自然界に最も多く見られる有機分子である糖質は、糖を基本単位として形成されている。糖質の種類はグルコースやフルクトースのような単糖から、数千の糖を含む重合体である多糖まで多岐にわたる。糖質は、生体中で様々な役割を担っており、特にグルコースは動植物にとって主要な糖質エネルギー源である。それだけでなく、グルコースは他の分子の形成における代謝中間生成物として生体システムで重要な役割を果たしている。

グルコースが血液に放出される際、膵臓でインスリンが生成される。この生理作用は、血糖値を抑制する作用を有している。しかし、インスリンの分泌不足または標的細胞がインスリンに反応しない時、血中グルコース濃度が上昇し、糖尿病と診断される。すなわち、血中グルコース濃度と糖尿病は相関関係にある。さらに、血清や尿中のグルコースレベルも人間の健康条件の指標となっている。

糖混合物中のグルコース定量は、グルコースオキシダーゼの特異的な酵素反応と比色を組み合わせて容易に行うことができる。現在、グルコースオキシダーゼ (GOD) と西洋わさびペルオキシダー (POD) を用いたグルコース定量法 (GOD-POD 法) が実用化されている<sup>1</sup> (Fig. 1)。しかし、PODは天然酵素であり、製造コストが高い、安定性が低い、環境や条件に左右されるなどの欠点が存在する<sup>2</sup>。

この欠点を克服するために、PODの代わりとなる金属酸化物 (CoFeO<sub>3</sub>、MnO<sub>2</sub>)<sup>3,4</sup> 金属ナノ粒子 (Ru、Pt)<sup>5</sup>、金属複合体 (Zn-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>、Cu-rGO)<sup>6,7</sup>などのペルオキシダーゼ様活性をもつ金属ナノ酵素の研究開発が盛んに行われている。

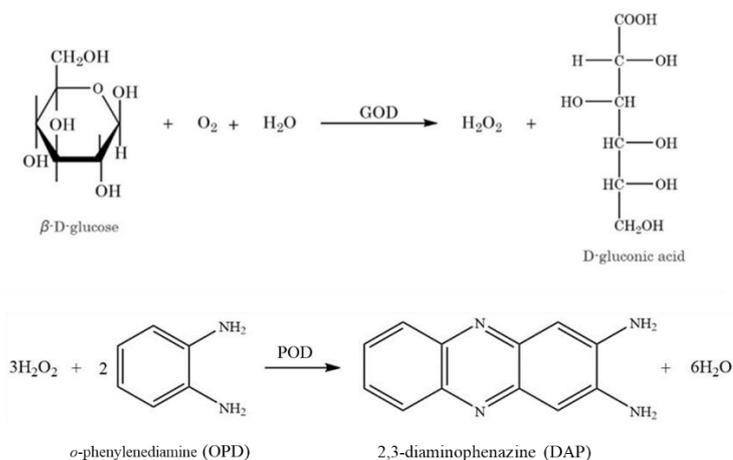


Fig. 1. GOD-POD method.

## 1-2 過酸化水素

過酸化水素の無水物は、無色で粘性のある油状の液体である。融点 $-0.89^{\circ}\text{C}$ 、沸点 $69.7^{\circ}\text{C}$  (28mmHg),  $152.1^{\circ}\text{C}$  (1atm), 比重1.465 ( $0^{\circ}\text{C}$ ) で、水やアルコールに可溶である。非常に不安定な物質であり、 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 46.2 \text{ kcal}$  のような分解が常温でも生じる。そのため、一般に尿酸やリン酸、アセトアニリド等が安定剤として使用されている。また、強力な酸化作用を持ち、有機物や金属粉と接触すると、発火あるいは爆発の危険性がある。グルコースに酸素、水、グルコースオキシダーゼをそれぞれ加えると、反応し、グルコースと等量の過酸化水素とグルコン酸が生成される。

また、近年、ペルオキシダーゼ様活性をもつ触媒を利用した過酸化水素の定量法の開発も活発に行われている。ペルオキシダーゼ様活性をもつ触媒は、血糖値を測定するだけでなく、タンパク質の測定やがん細胞の定量法 (CELISA法) の二次抗体としても活躍が期待されている。ペルオキシダーゼ様活性やオキシダーゼ活性をもつ触媒を用いることで呈色試薬を呈色させることで、比色法や蛍光法によりがん細胞の定量を可能にする<sup>8</sup>。

### 1-3 酸化銅

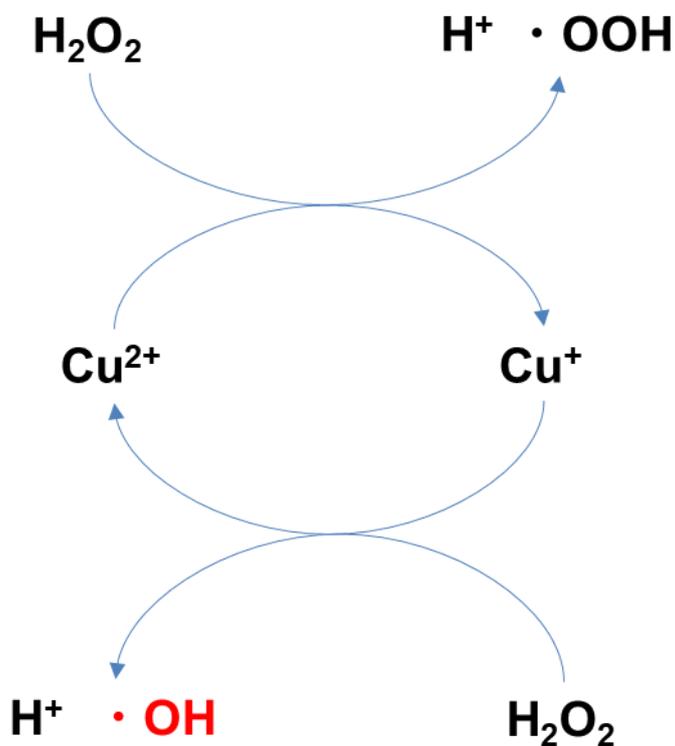
天然酵素である POD の代替りとなる金属ナノ材料は多く研究されている。これまでに銅や酸化銅がペルオキシダーゼ様活性を持つことが知られている。酸化銅は、低コスト、安定といった利点を有しており、POD の代替物となる可能性を秘めており、本研究では、酸化銅のペルオキシダーゼ様活性の向上を試みた。

#### 1-3-1 ソフトテンプレートを用いた合成法

ソフトテンプレートとしてポリエチレングリコール (PEG) を用いて合成した酸化銅 (PEG-CuO) の抗菌作用が向上するという報告されている<sup>9</sup>。抗菌作用の向上には、ヒドロキシラジカル、スーパーオキシドラジカルなどのラジカル種の生成量が増加することが重要である<sup>10</sup>。ペルオキシダーゼ様活性を持つ触媒は、過酸化水素からヒドロキシラジカルを生成する反応を触媒する。そのため、ラジカル種の生成量を増加させる PEG-CuO 合成の手法はペルオキシダーゼ様活性の向上にも応用できると考え、本研究に用いた。

1-3-2  $\text{Cu}_2\text{O}$  の存在の有用性

酸化銅が過酸化水素からヒドロキシラジカルを生成する際のメカニズムが次のように報告されている (Scheme 1) <sup>11</sup>。  $\text{Cu}^{2+}$  から  $\text{Cu}^+$  に変化するとき、 $\cdot\text{OOH}$  を生成し、  $\text{Cu}^+$  から  $\text{Cu}^{2+}$  に変化するとき  $\cdot\text{OH}$  を生成する。この報告から  $\text{Cu}^{2+}$  と  $\text{Cu}^+$  のサイクルがペルオキシダーゼ様活性の向上に関わっていることがわかる。しかし、  $\text{Cu}^{2+}$  と  $\text{Cu}^+$  を意図的に共存させてペルオキシダーゼ様活性の向上を試みた研究は私の知る限り、まだ行われていない。そこで、本研究では、Nドープや金属の還元反応を起こすことが知られているメラミン <sup>12,13</sup> を塩化銅・二水和物、PEG とともに、焼成を行うことで  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  の合成を行い、過酸化水素、グルコース定量法の開発を行った。

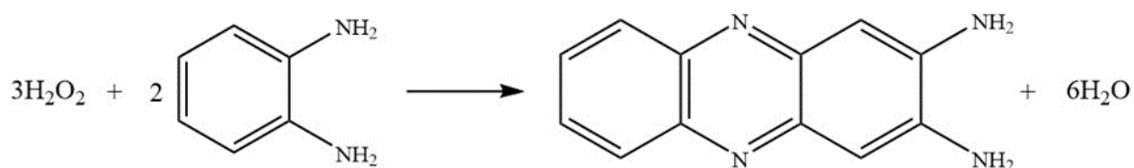


**Scheme. 1.** Hydroxyl radical generation mechanism from hydrogen peroxide using  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cu}^+$ .

1-4 *o*-phenylenediamine

酸化銅の触媒を受け、2,3-ジアミノフェナジン (DAP) へ酸化し、黄色を呈色する。*o*-フェニレンジアミン (OPD) の酸化は、金属イオンの検出や導電性ポリマーの調製、農薬、染料等の多くの用途に利用されている。OPD は無色の非蛍光性化合物であり、酸化剤である過酸化水素によって酸化され、DAP を主とする酸化生成物を生成する。OPD から DAP への酸化は、オキシゲナーゼ/オキシダーゼやペルオキシダーゼ等の酵素触媒反応のイムノアッセイ測定において非常に重要である。

OPD 1 mol に対して  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.5 mol が消費され、DAP 0.5 mol が生成する。触媒が存在しない条件でも OPD は酸化されるが、 $\text{H}_2\text{O}_2$  が希薄であれば、DAP はほぼ定量的に生成する。



**Fig. 2.** Oxidation reaction of OPD by  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 1-5 蛍光分析法

物理学的定義に従い、蛍光とは、光に晒されている間、目立って活性を弱めることなく、自ら光を放つ、種々な物質の性質と理解されている。Stokes の原理通り、“蛍光を発する”物質から放出された光は、その物質によって吸収された光よりも、長波長を有する。蛍光分析法は、この蛍光を発することを利用し、物質に励起波長の光を照射し、蛍光強度を測定することで、物質を定量もしくは定性分析する方法である。測定は光源光を適当に分光して一定波長の光を励起光とし、試料から放出される蛍光を分光光度計で測定する。光源はキセノンランプや水銀ランプ等可視部から紫外部にかけて高い輝度をもつものが用いられるが、稀にレーザーのような単色性のよい高輝度光源が用いられることもある。

生物医化学や臨床化学は、定量成分の吸収および発光スペクトルと重なる恐れのある多数の共存物質を含む血液や血清、尿、組織、タンパク質加水分解生成物、種々の新陳代謝産物等の生体試料を取り扱う科学であることから、多くの複雑な問題を抱えている。近時、蛍光分析法は医化学や臨床化学、有機化学、生物化学の諸分野において、有機物質や生体関連物質の同定ならびに定量分析に応用されている。元来、蛍光分析法は放射の吸収に基づく分析法より感度が高い。これは、入射光の放射束  $P_0$  とは無関係に蛍光の放射束  $F$  を測定することができるからである。蛍光の測定感度は、 $P_0$  を大きくする、または蛍光放射の信号を増幅することによって増大させることができる。蛍光分析法を用いれば、ppb レベルの定量をかなり一般的に行うことができる。また、選択性および定量範囲が広い点でも優れている。一般に、濃度の他に pH、温度、共存イオンの濃度等の要素が蛍光の強度に影響を与える。したがって検量線の作成は、未知試料を定量するときと同条件下で行うことが普通である。

本研究でのグルコース定量法の他にも、けん化を利用する総血清コレステロールの蛍光分析や血液中ガラクトースの自動蛍光分析、ヒト血清のたんぱく除去液中のアンモニア蛍光定量、蛍光法による細胞内液の pH 測定、生体中のテトラサイクリンの蛍光定量、赤血球ウロポルフィリノーゲン I シンターゼ活性の蛍光測定による急性間欠性ポルフィリン症診断、蛍光分光法による肝疾患患者の血清胆汁酸の動向検査、血漿不エステル化脂肪酸の蛍光定量、チオバルビツール酸アッセイによる DNA の蛍光微量定量等にも用いられている。

## 1-6 本研究の目的

グルコースの検出は、医療の臨床診断において重要である。血中での高いグルコース濃度は糖尿病と診断でき、精度の高い簡便なグルコース濃度の測定方法が医療現場で求められている。一般的なグルコース定量法として、グルコースオキシダーゼ (GOD) と天然酵素であるペルオキシダーゼ (POD) を用いたグルコース定量法 (GOD-POD 法) が実用化されている。しかし POD は、コストが高く、安定性が低い等の欠点を有する。この欠点を克服するために、POD の代替となる金属酸化物や金属ナノ粒子等のペルオキシダーゼ様活性を有する金属ナノ酵素の研究開発が行われている。なかでも、酸化銅 (CuO) はペルオキシダーゼ様活性を示すことが知られており、POD の代替となる可能性がある。そこで本研究では、ペルオキシダーゼ様活性が高い酸化銅ベース金属ナノ酵素の合成法を確立し、グルコースの高感度な定量法の開発を行った。

## 第2章 実験

### 2-1 使用器具

・化学天秤	AUX 120	(株)島津製作所
・超音波洗浄機	SUP-10	柴田科学(株)
・pH メーター	D-51	(株)堀場製作所
・遠心分離機 卓上小型遠心機	2410	KUBOTA(株)
・電気炉		

### 2-2 分析機器

・紫外可視分光光度計	UV-2450	(株)島津製作所
・分光蛍光光度計	RF-5300P	(株)島津製作所
・分光蛍光光度計	FP-8500	日本分光(株)
・X線回折装置 (XRD)	Ultima IV	(株)リガク
・X線光電子分光分析装置 (XPS)	PHI Quantera SXM	アルバックファイ(株)
・BET 表面積測定装置	BELPREP-vac II	BEL JAPAN(株)
・振動試料磁力計 (VSM)	JXA-8530F	日本電子(株)
・透過型電子顕微鏡 (TEM)	JEM-1011	日本電子(株)
・走査型電子顕微鏡 (SEM)	S-4000	(株)日立製作所

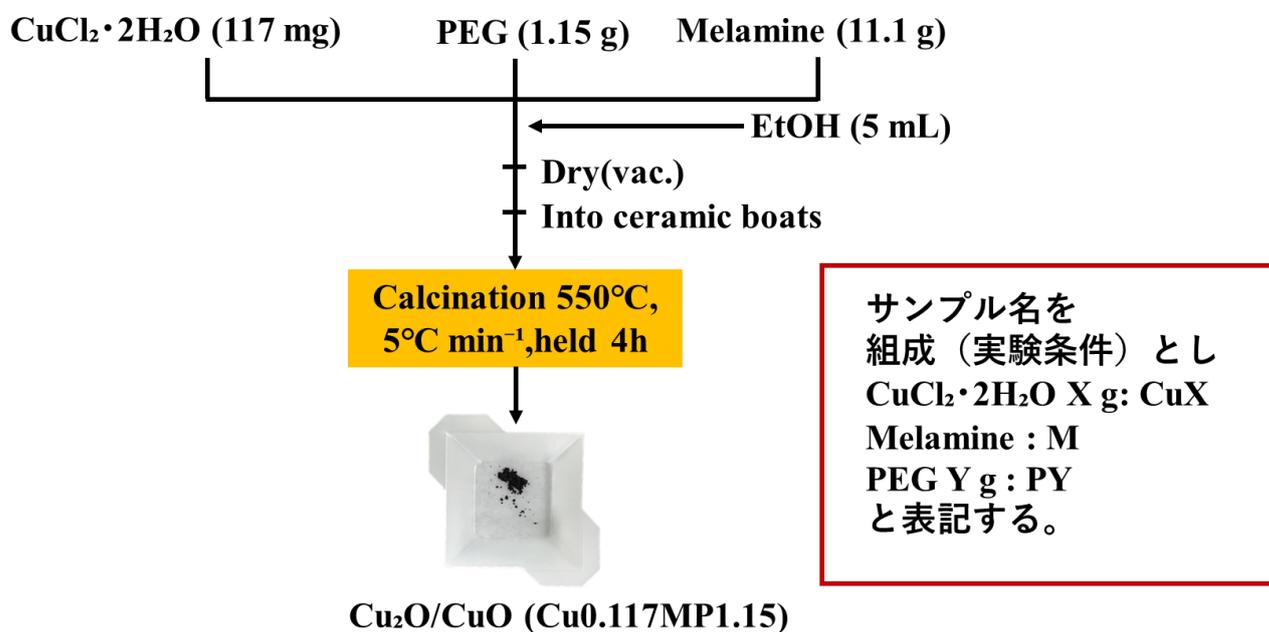
### 2-3 実験試薬

・メラミン	$C_3H_6N_6$	関東化学(株)
・ポリエチレングリコール 1500		半井化学薬品(株)
・塩化銅二水和物	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	半井化学薬品(株)
・酢酸	$CH_3COOH$	半井化学薬品(株)
・酢酸ナトリウム	$CH_3COONa$	半井化学薬品(株)
・酸化銅	$CuO$	Sigma-Aldrich
・酸化銅(I)	$Cu_2O$	Sigma-Aldrich
・リン酸二水素ナトリウム・2水和物	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	半井化学薬品(株)
・リン酸水素二ナトリウム	$Na_2HPO_4$	和光純薬工業(株)
・o-フェニレンジアミン二塩酸塩	$C_6H_8N_2 \cdot 2HCl$	東京化成工業(株)
・過酸化水素	$H_2O_2$	和光純薬工業(株)
・D(+)-グルコース	$C_6H_{12}O_6$	和光純薬工業(株)
・西洋わさびペルオキシダーゼ		和光純薬工業(株)
・グルコースオキシダーゼ		和光純薬工業(株)
・グルコース認証実用標準物質		(社)検査医学標準物質機構

## 2-4 実験操作

### 2-4-1 $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$ の調製方法

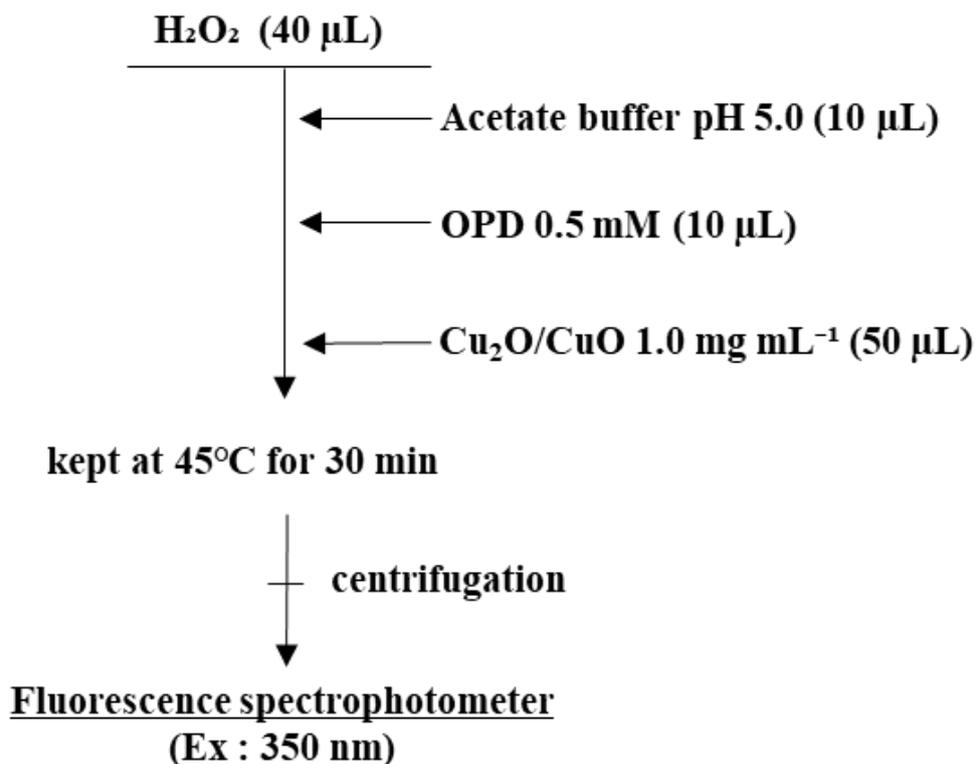
$\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  の合成は次の方法で行った。Melamine (11.1 g) と  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (117 mg)、PEG-1500 (1.15 g) を測り取り、乳鉢で混合しエタノール 5 mL を入れた。次に真空乾燥を行い青緑色の粉末を得た。得られた粉末をセラミックボートに移し、昇温速度  $5\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  で  $550^\circ\text{C}$  にし、4 時間焼成した。黒色粉末 (22.1 mg) が得られた。次に得られた粉末を蒸留水に分散させ  $1\text{ mg mL}^{-1}$  に調製した。



**Fig. 3.** Preparation of  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  nanosheet.

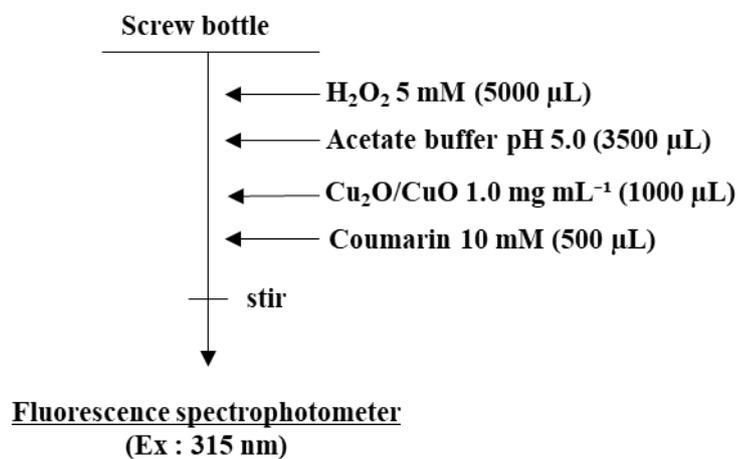
#### 2-4-2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 検出の実験手順

マイクロチューブに各種濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 μL)、酢酸緩衝溶液 pH 5.0, 0.1 M (10 μL)、OPD 0.1 M (10 μL)、Cu<sub>2</sub>O/CuO 1 mg/mL (50 μL) をそれぞれ加え、水温 45°C で 40 分間保った。反応後、遠心分離で触媒を除去した。溶液から 50 μL 分取し、分光光度計 (励起波長 350 nm) で測定した。



**Fig. 4.** Experimental procedure for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection.

## 2-4-3 Coumarin によるヒドロキシラジカルの捕捉実験の手順

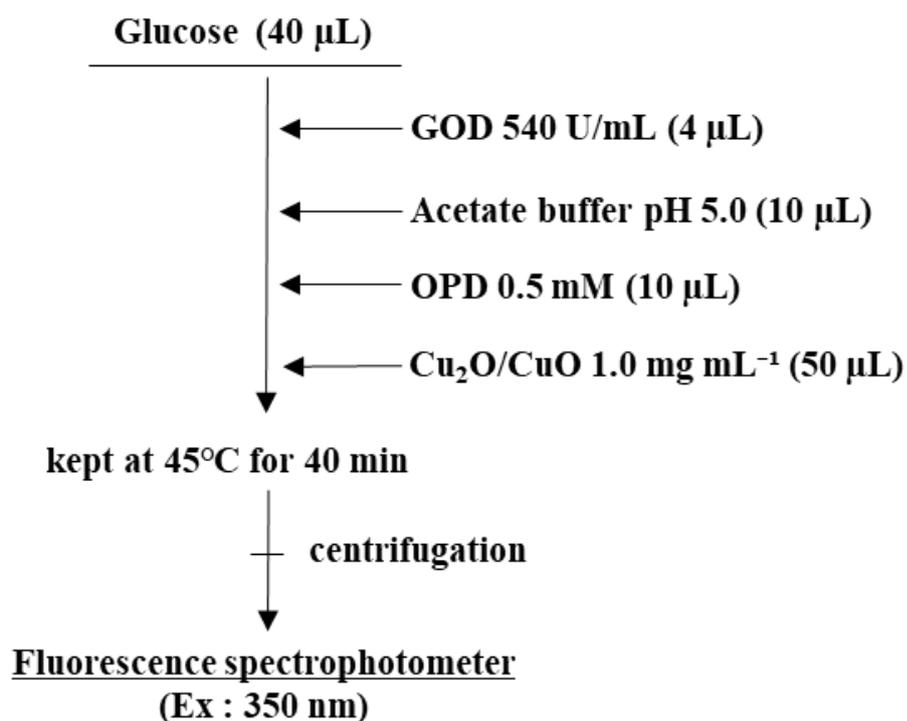


**Fig. 5.** Experimental procedure for  $\text{H}_2\text{O}_2$  detection.

クマリンは、7-ヒドロキシクマリンとなることが知られている。本研究では、励起波長 315 nm、蛍光波長 540 nm のピークを観測した。

#### 2-4-4 グルコース検出の実験手順

マイクロチューブに各種濃度のグルコース (40  $\mu\text{L}$ )、グルコースオキシダーゼ (GOD) 約 570 U/mL (4  $\mu\text{L}$ )、酢酸緩衝溶液 pH 5.0, 0.1 M (10  $\mu\text{L}$ )、OPD 0.5 mM (10  $\mu\text{L}$ )、 $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  1 mg/mL (50  $\mu\text{L}$ ) をそれぞれ加え、水温 45°C で 40 分間保った。反応後、遠心分離で触媒を除去した。溶液から 50  $\mu\text{L}$  分取し、分光光度計 (励起波長 350 nm) で測定した。

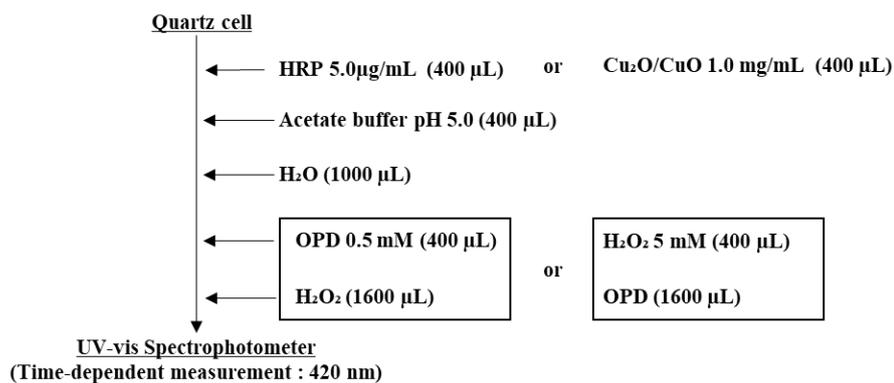


**Fig. 6.** Experimental procedure for glucose detection.

### 2-4-5 速度論的分析の実験手順

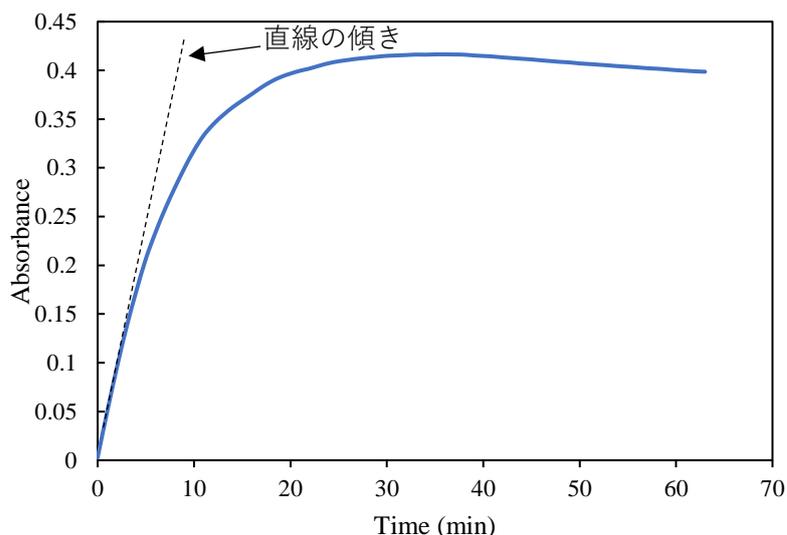
天然酵素と酸化銅の活性を比較するために、速度論的分析を行い、定常状態の速度定数であるミカエリス・メンテン定数( $K_m$ )と最大反応速度( $V_{max}$ )を求めた。 $K_m$ と $V_{max}$ を求めるためには、一方の基質濃度を固定し、一方の基質濃度を変化させて、時間変化測定を行い、初速度を求める必要がある。

速度論的分析の実験は以下の手順で行った(Fig. 7)。



**Fig. 7.** Experimental procedures.

本研究では、420 nm の吸光度を時間変化測定で観測し、反応の初速度は、時間変化測定で得られた曲線の最初の部分の直線範囲の傾きから求めた。



**Fig. 8.** Initial velocity calculation method.

#### 2-4-6 速度論的定数( $K_m$ と $V_{max}$ )の導出

定常状態の速度定数 ( $K_m$  および  $V_{max}$ ) は、ミカエリス・メンテン方程式(1)の二重逆数プロットである Line-Weaver-Burk プロット(2)を用いて算出した。

$$v = V_{max} \times [S]/(K_m + [S]) \quad (1)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left( \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

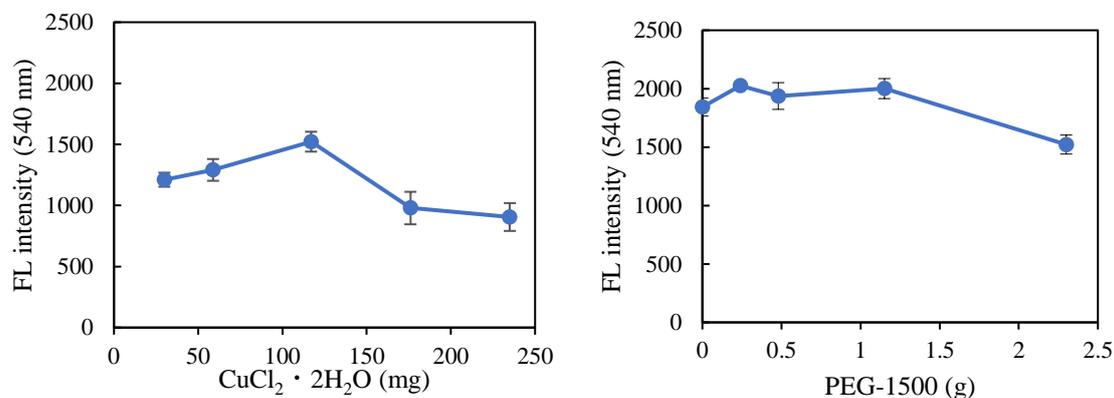
$v$  : 初速度

$[S]$  : 基質濃度

$K_m$  は酵素に固有な定数であり、酵素と基質の親和性の指標である。 $K_m$  の値が低いほど、酵素の基質への親和性は高い。 $V_{max}$  の値は、これ以上 $[S]$ を増やしても $v$ が増加しない酵素の触媒限界を表す値であり、理論値である。

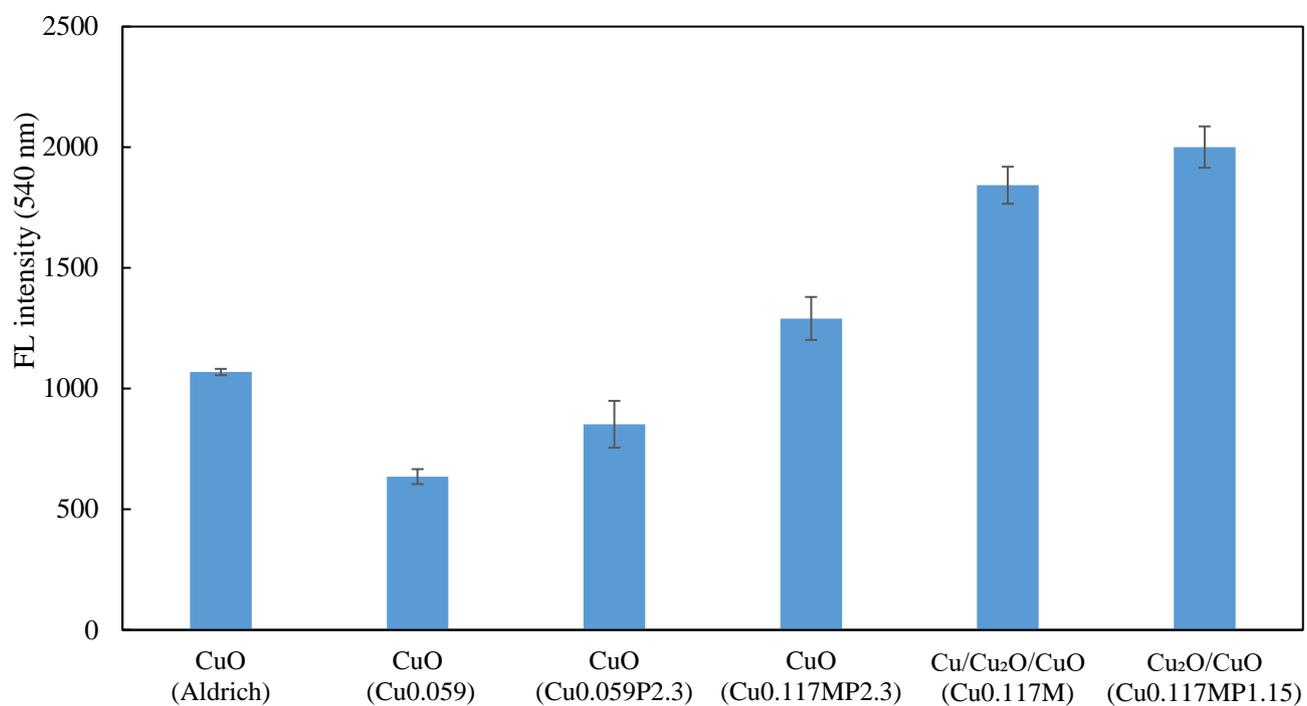
### 第3章 $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$ の合成

#### 3-1 $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$ の合成条件の最適化



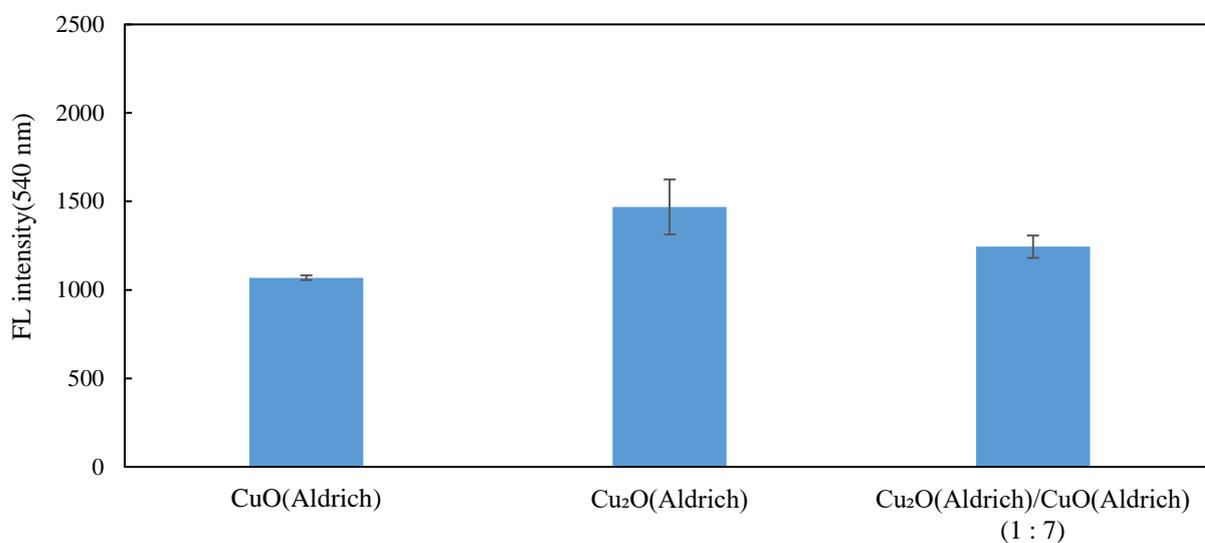
**Fig. 9.** Optimization of (a)  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and (b) PEG-1500 loading amount.

$\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  の合成を行う際に、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  と PEG-1500 の量の最適化を行った。Fig. 9 (a) は、Melamine を 11.1 g、PEG-1500 を 2.3 g に固定して、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  の量の最適化を行った時の結果である。 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  の量が 117 mg のとき、最も蛍光強度が強くなり、ペルオキシダーゼ様活性が最も高いという結果が得られた。Fig 9 (b) は、Melamine を 11.1 g、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を 117 mg に固定して、PEG-1500 の量の最適化を行ったときの結果である。PEG-1500 の量を変化させていったとき、PEG-1500 が 2.3 g のとき、蛍光強度は低く、ペルオキシダーゼ様活性が最も低かった。また、PEG-1500 の量が 0 g と比較して PEG が存在している場合 (0.28 g、0.58 g、1.15 g) の方がペルオキシダーゼ様活性は高くなるという結果が得られた。本研究では、PEG-1500 の最適量を 1.15 g として触媒の合成を行った。

3-1-1  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  と他の条件との比較

**Fig. 10.** Comparison of peroxidase-like activity.

サンプル名を組成 (実験条件) とし、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  X g を CuX、Melamine を M、PEG-1500 Y g を PY と表記した。他の条件と比較して、 $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  (CuMP1.15) が最もペルオキシダーゼ様活性が高くなるという結果が得られた。また、市販の酸化銅よりも活性は高かった。

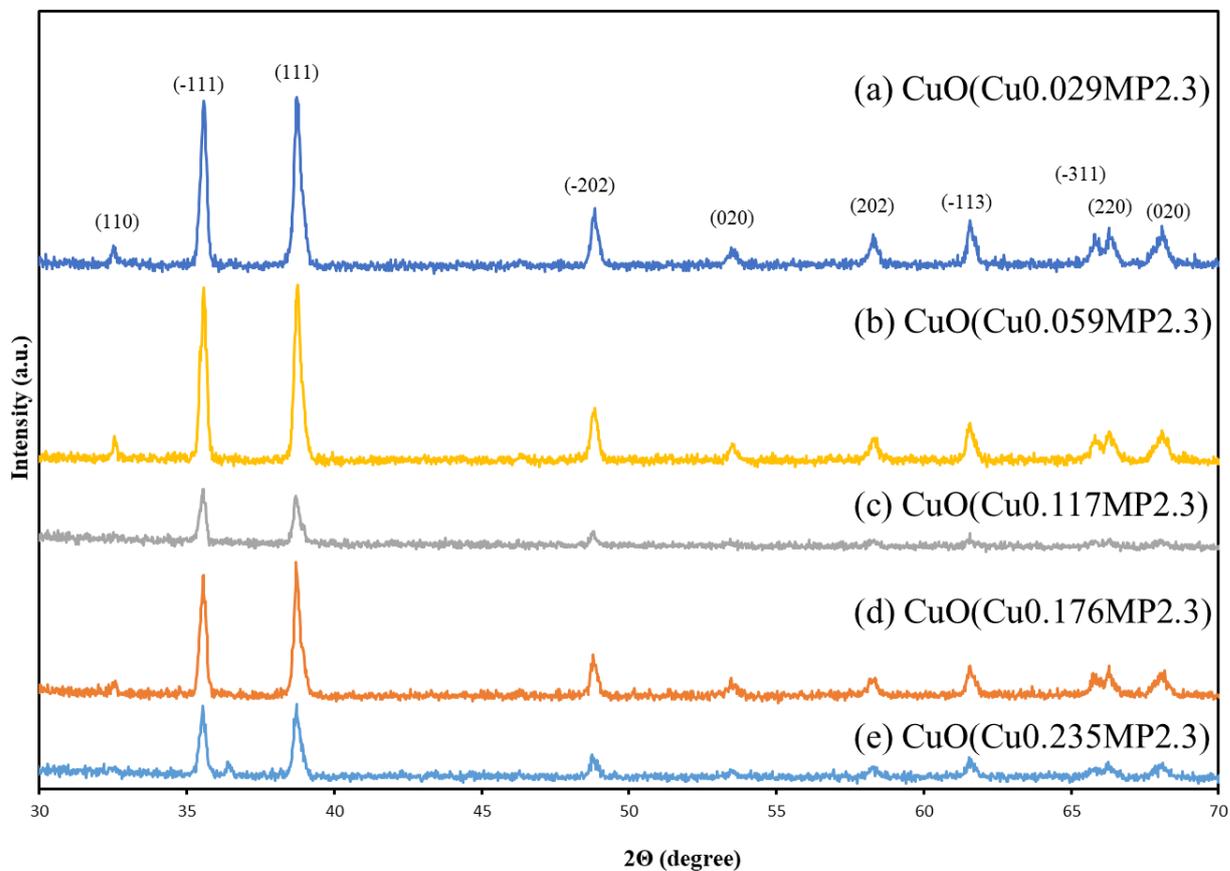
3-1-2 市販品の  $\text{Cu}_2\text{O}$  (Aldrich) と  $\text{CuO}$  (Aldrich) を混合したときの活性

**Fig. 11.** Comparison of peroxidase-like activity of commercially available copper oxide.

市販の  $\text{CuO}$ 、 $\text{Cu}_2\text{O}$ 、 $\text{Cu}_2\text{O}$  (Aldrich) /  $\text{CuO}$  (Aldrich) (1 : 7) をそれぞれ比較した結果を示す。 $\text{CuO}$  よりも  $\text{Cu}_2\text{O}$  の方がペルオキシダーゼ様活性は高いことが分かる。また、 $\text{Cu}_2\text{O}$  と  $\text{CuO}$  を物理混合した  $\text{Cu}_2\text{O}$  (Aldrich) /  $\text{CuO}$  (Aldrich) (1 : 7) は、 $\text{Cu}_2\text{O}$  を混合することで  $\text{CuO}$  よりも活性が高くなることが分かった。このことから  $\text{CuO}$  と  $\text{Cu}_2\text{O}$  を共存させることは  $\text{CuO}$  のペルオキシダーゼ様活性を高める方法として有用であることが分かる。

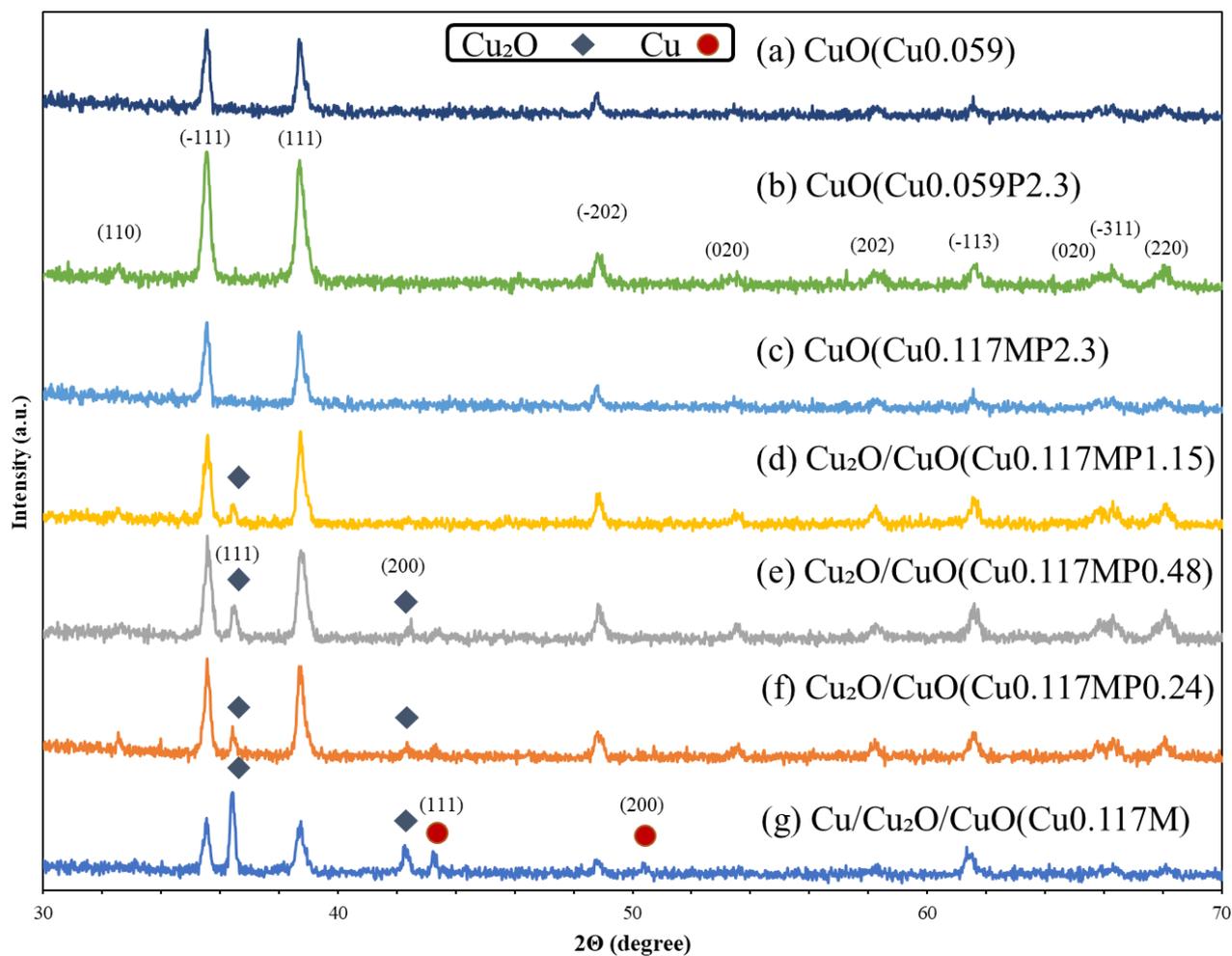
3-2  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  の特性評価

## 3-2-1 XRD



**Fig. 12.** XRD patterns of (a) CuO (Cu0.029MP2.3), (b) CuO (Cu0.059MP2.3), (c) CuO (Cu0.117MP2.3), (d) CuO (Cu0.176MP2.3) (e)  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  (Cu0.235MP2.3).

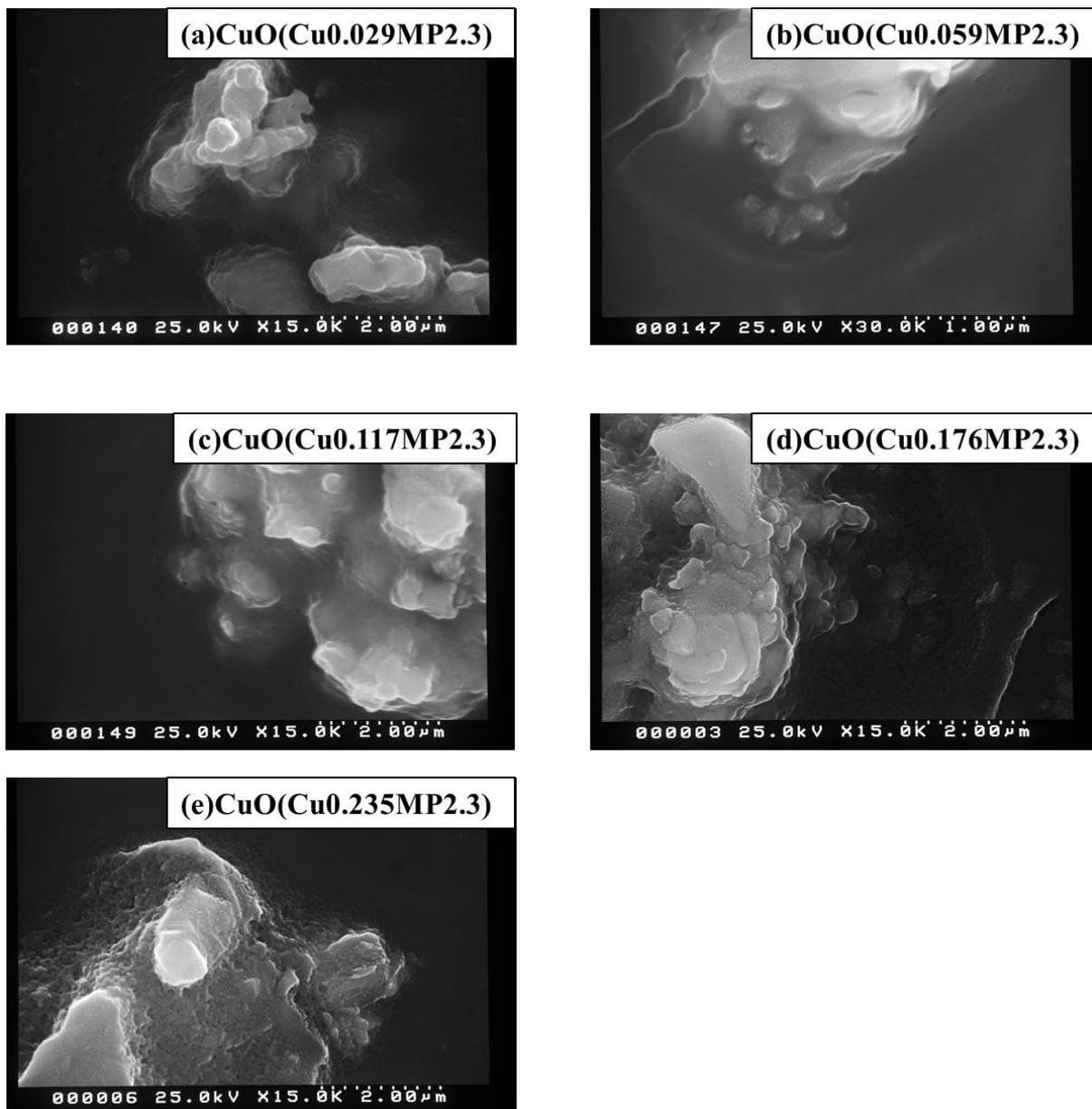
メラミン 11.1 g、PEG 2.3 g で固定し、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  の量を変化させたとき、合成した試料では、すべて酸化銅のピークのみが観測された。



**Fig. 13.** XRD patterns of (a) CuO (Cu), (b) CuO (CuP2.3), (c) CuO (CuMP2.3), (d) Cu<sub>2</sub>O/CuO (CuMP1.15) (e) Cu<sub>2</sub>O/CuO (CuMP0.48) (f) Cu<sub>2</sub>O/CuO (CuMP0.24) (g) Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO (CuM).

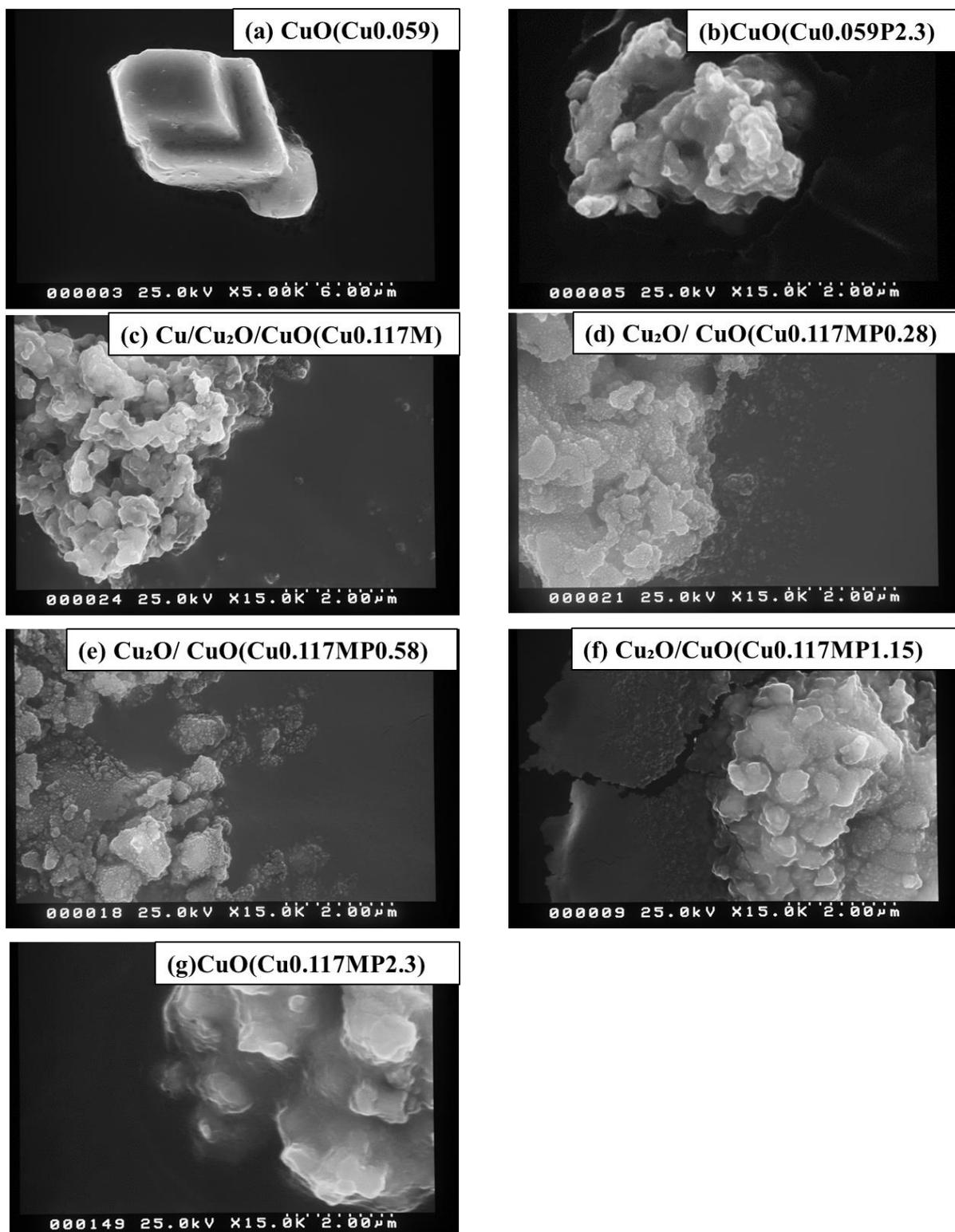
Fig. 13 では合成した触媒の XRD パターンを示す。CuCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O で合成した CuO (Cu) 、CuCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O と PEG-1500 で合成した CuO (CuP2.3) では、CuO のピークのみが観測された。Melamine と CuCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O のみで焼成すると Cu と Cu<sub>2</sub>O が生成することが分かる<sup>14</sup>。このことから Melamine を加えることで還元反応を起こしていることが確認できた。Melamine を加えて、PEG の量を減らしていくと、Cu<sub>2</sub>O のピークと CuO のピークが観測され、Cu<sub>2</sub>O/CuO の合成に成功していることが分かった。

## 3-2-2 SEM



**Fig. 14.** SEM images of XRD patterns of (a) CuO (Cu0.029MP2.3), (b) CuO (Cu0.059MP2.3), (c) CuO (Cu0.117MP2.3), (d) CuO (Cu0.176MP2.3) (e) Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.235MP2.3).

CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O の担持量を増やしていくと、PEG とメラミンに接する面積比が増えるため、シート状の部分が増えていく様子が見られた。



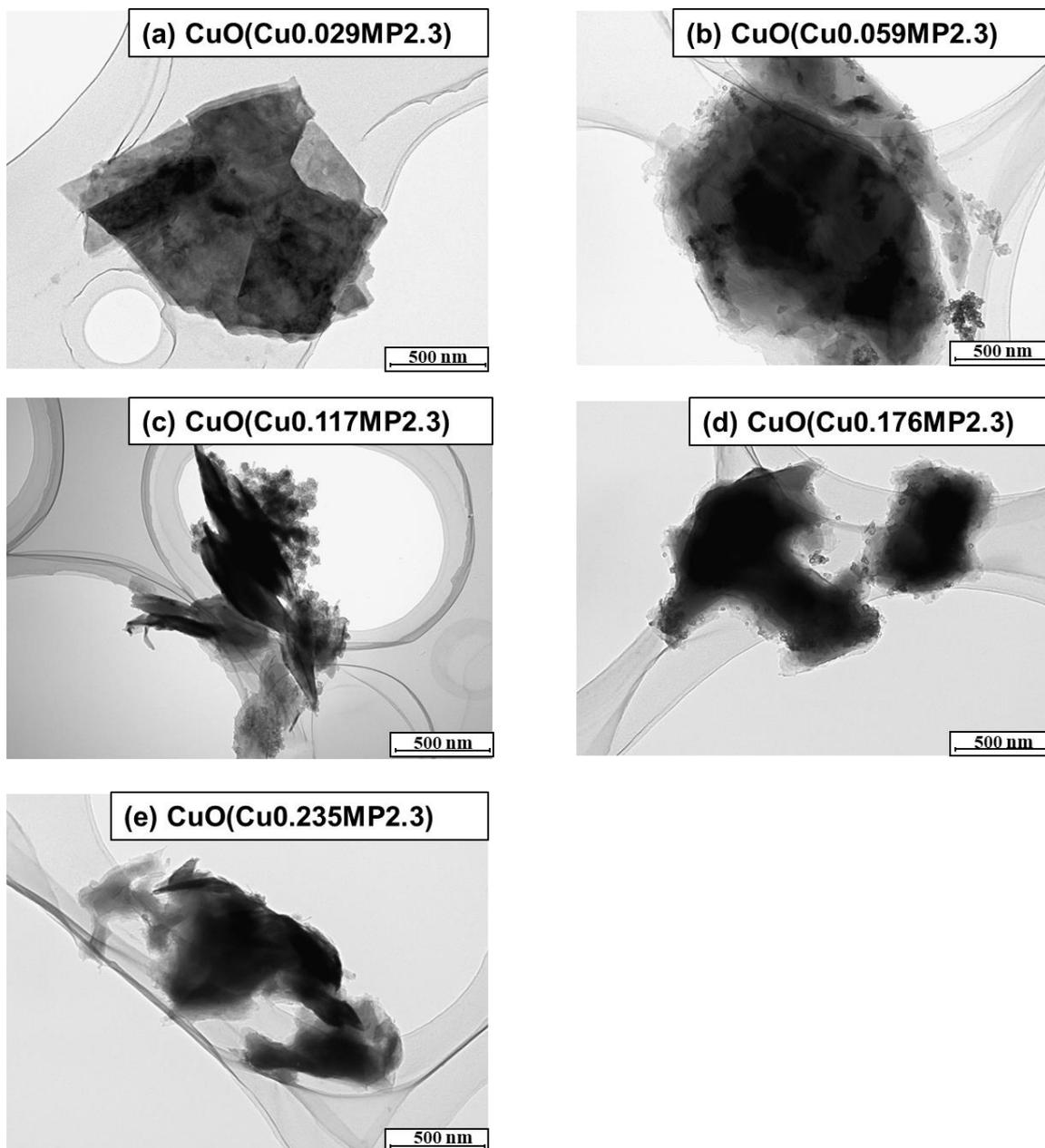
**Fig. 15.** SEM images of (a)  $\text{CuO}(\text{Cu}0.059)$ , (b)  $\text{CuO}(\text{Cu}0.059\text{P}2.3)$ , (c)  $\text{Cu}/\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}(\text{Cu}0.117\text{M})$ , (d)  $\text{CuO}(\text{Cu}0.117\text{MP}2.3)$ , (e)  $\text{CuO}(\text{Cu}0.117\text{MP}2.3)$ , (f)  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}(\text{Cu}0.117\text{MP}1.15)$ , (f)  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}(\text{Cu}0.117\text{MP}0.58)$ , (g)  $\text{CuO}(\text{Cu}0.117\text{MP}2.3)$ .

Fig. 15 の (a) と (b) を比較して、PEG を入れて合成した (a) CuO (Cu0.059P2.3) は、(b) CuO (Cu0.059) よりも粒子の表面が荒くなっていることが分かる。このことから PEG には、酸化銅の表面の粒子を荒くする効果があることが分かった。

Melamine を加えて合成した (c) Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117M) では、シート状の部分と粒子状の部分が観測された。このことから Melamine を加えることでシート状の酸化銅を形成することができることが分かった。

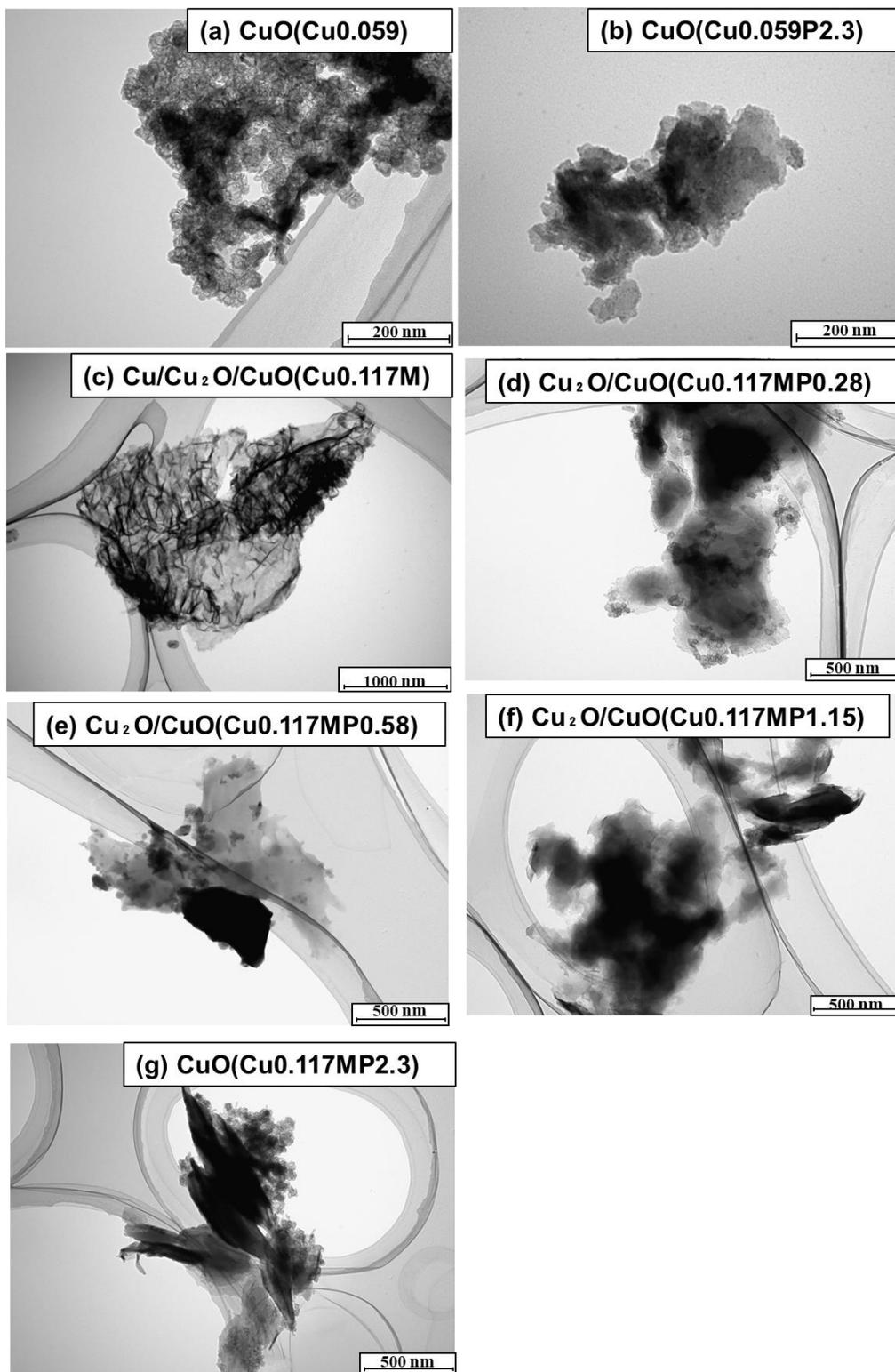
(c)と比較して、Melamine と PEG の両方を加えた (d) Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117MP0.28) 、(e) Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117MP0.58) では、Melamine によって形成されたシート状の酸化銅と粒子の部分が PEG によって表面が荒くなっていることが分かる。(f) Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117MP1.15) では、シート状が PEG によって壊されている様子が観測された。さらに、PEG の量を増やした (g) CuO (Cu0.117MP2.3) では、PEG によって壊されたシート状の酸化銅が凝集している様子が見られた。このことから PEG と Melamine の両方を加えることで、より細かいシート状の酸化銅を合成することができることがわかった。

## 3-2-3 TEM



**Fig. 16.** TEM images of XRD patterns of (a) CuO (Cu0.029MP2.3), (b) CuO (Cu0.059MP2.3), (c) CuO (Cu0.117MP2.3), (d) CuO (Cu0.176MP2.3) (e)  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  (Cu0.235MP2.3).

メラミンと PEG の両方を入れて合成した試料は、すべてシート状になっていることがわから



**Fig. 17.** TEM images of (a) CuO (Cu0.059), (b) CuO (Cu0.059P2.3), (c) Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117M), (d) CuO (Cu0.117MP2.3), (e) CuO (Cu0.117MP0.58), (f) Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117MP1.15), (g) CuO (Cu0.117MP2.3).

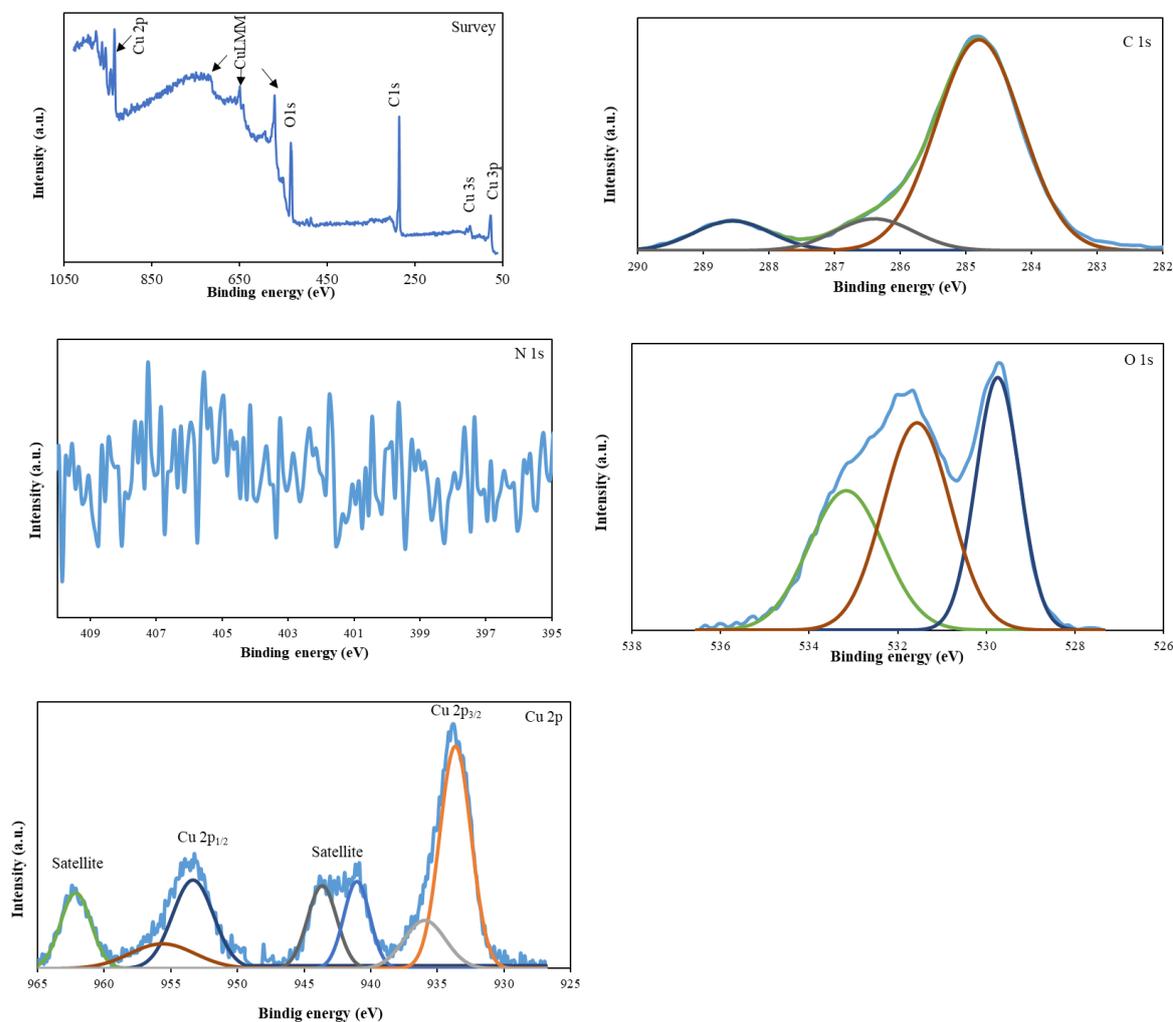
Fig. 17 の(a)と(b)を比較して、PEG を加えて合成した(b) CuO (Cu0.059P2.3) は、凝集した酸化銅の TEM 像ではあるが、(a) CuO (Cu0.059) よりも細かくなっていることが分かる。

Melamine を加えて合成した(c) Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117M)では、SEM でも観測されたようにシート状になっている様子が観測された。

Melamine と PEG の両方を入れて合成した(d) Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117MP0.28)、(e) Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117MP0.58)、(f) Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117MP1.15)、(g) CuO (Cu0.117MP2.3) は、(c) Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117M) よりもサイズがすべて小さくなっていることが分かる。

したがって、Melamine と PEG の両方を加えることによって、Melamine によって形成されたシート状の酸化銅が PEG によって壊されることによってシート状の酸化銅を細かくし、ナノシートを形成することわかる。

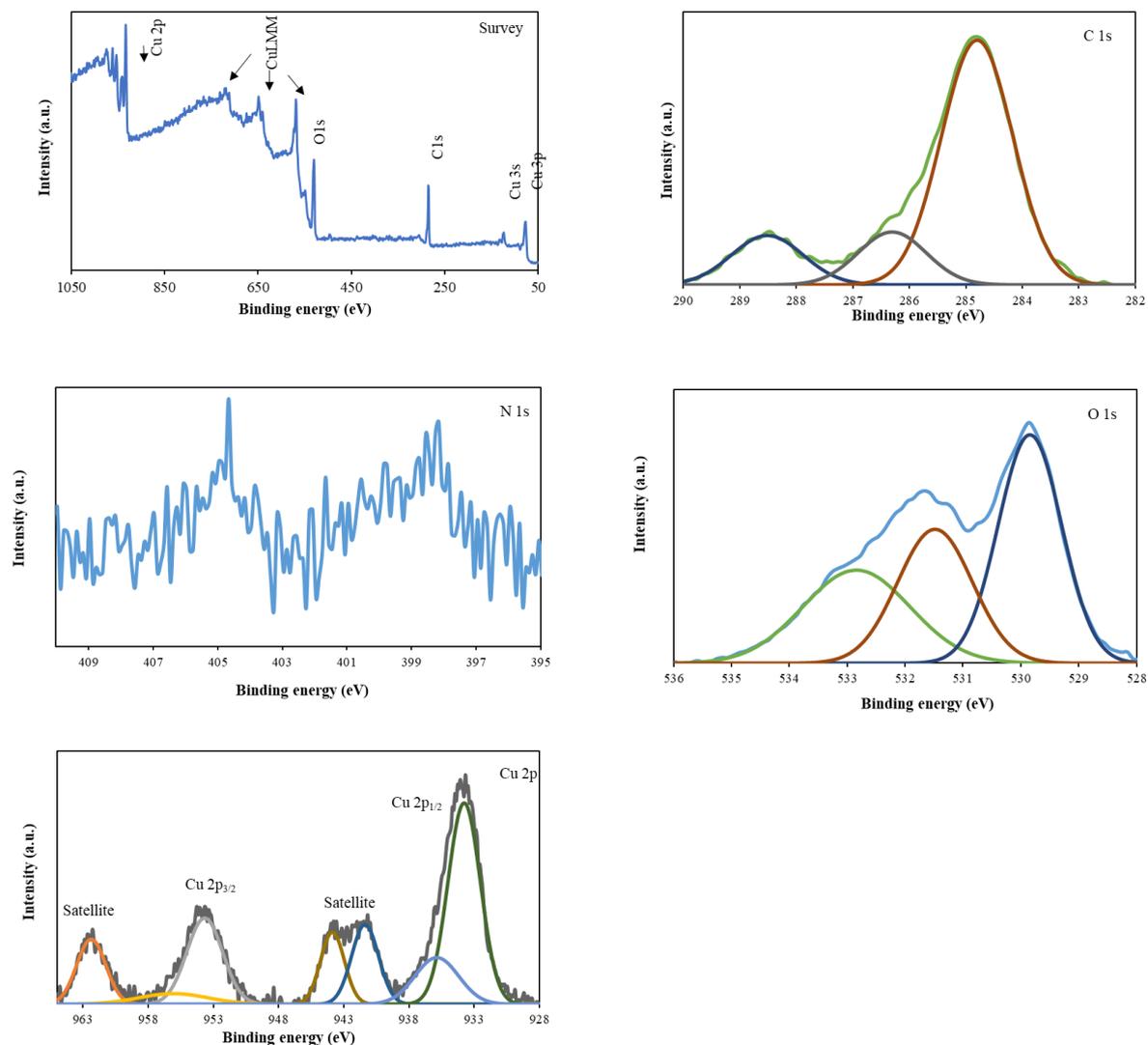
## 3-2-4 XPS



**Fig. 18.** XPS of  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  (Cu0.117MP1.15).

Fig. 18 は  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  (CuMP1.15) の XPS スペクトルである。Cu2p スペクトルでは、CuO の 2 つのピーク (934.4 eV と 954.4 eV) <sup>15</sup> と  $\text{CuCl}_2$  のピーク (934.6 eV と 954.6 eV) <sup>16</sup> が観測された。XRD では  $\text{Cu}_2\text{O}$  のピークが観測されたが、XPS では観測できなかった。N1s のピークは存在していないことから、PEG と Melamine を混合して焼成した場合は、グラファイト状窒化炭素は生成物に含まれていないことが分かる。

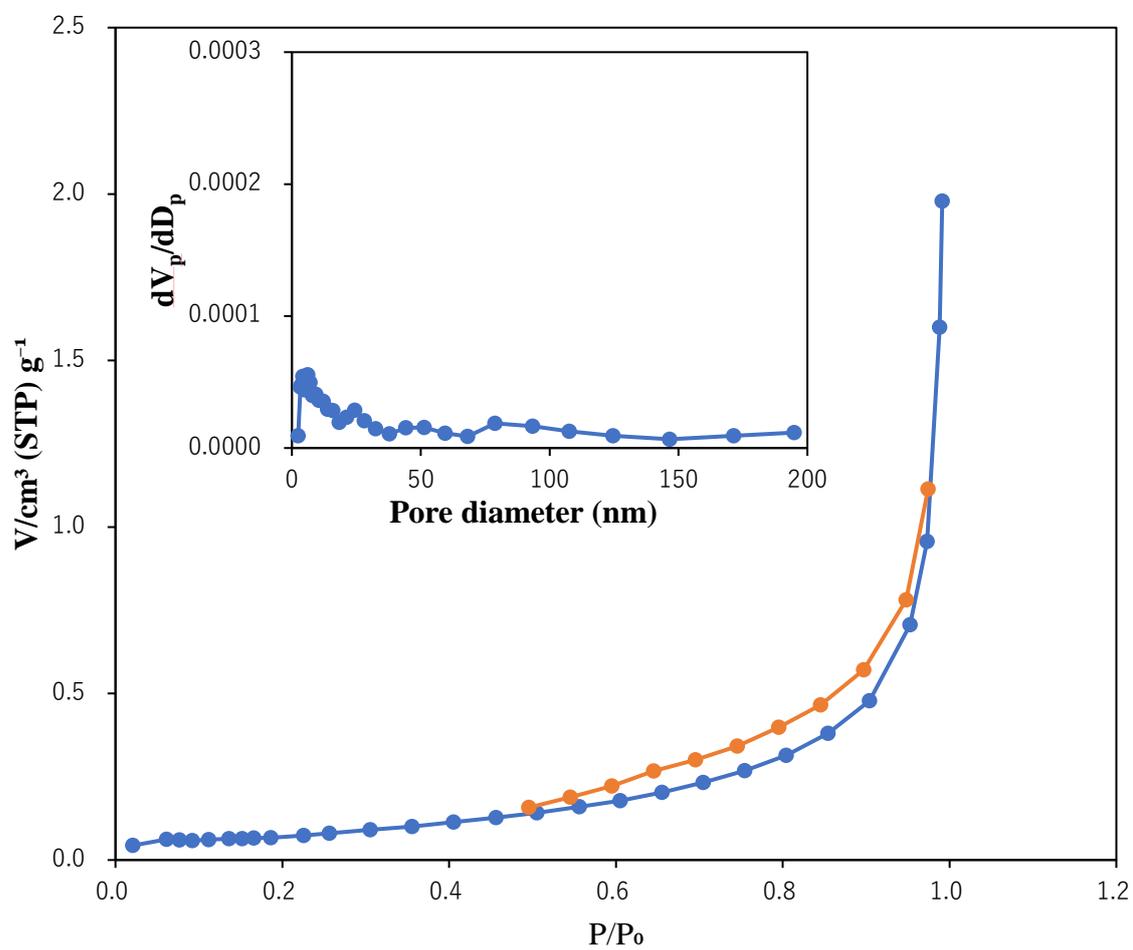
O1s スペクトラムでは、529.7 eV に CuO のピークが観測された。531.6 eV と 533.3 eV のピークは触媒中の水由来のピークである。



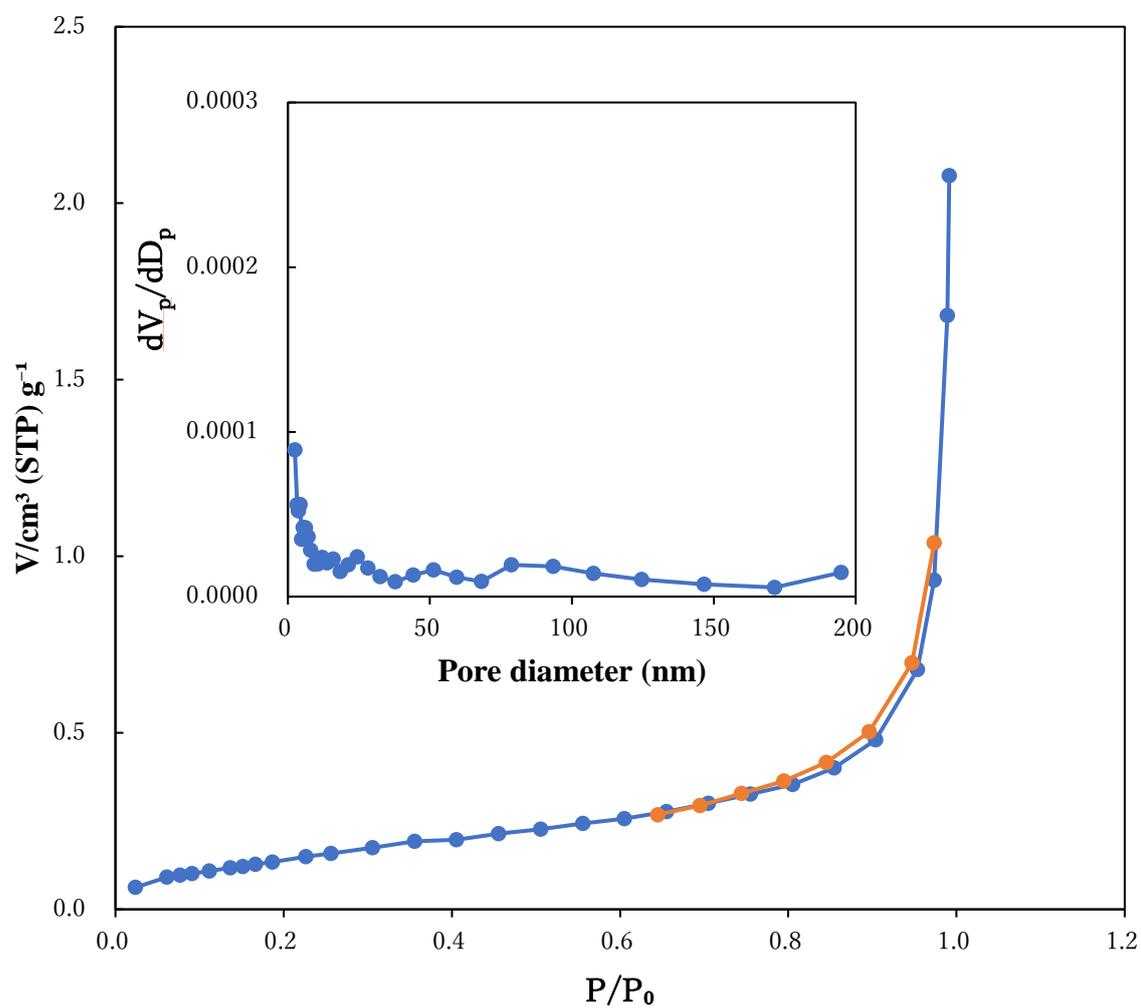
**Fig. 19.** XPS of Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu0.117M).

Fig. 19 は Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO (CuM) の XPS スペクトルである。Cu2p スペクトルでは、CuO の 2 つのピーク (933.4 eV と 953.4 eV) と CuCl<sub>2</sub> のピーク (934.7 eV と 954.67 eV) が観測された。XRD で観測された Cu と Cu<sub>2</sub>O は XPS では観測できなかった。O1s スペクトルでは、529.5 eV に CuO のピークと 531.4 eV に水のピークが観測された。また、N1s スペクトルでは、Cu<sub>2</sub>O/CuO (CuMP1.15) にはなかったメラミン由来の N のピークがわずかに観測された。

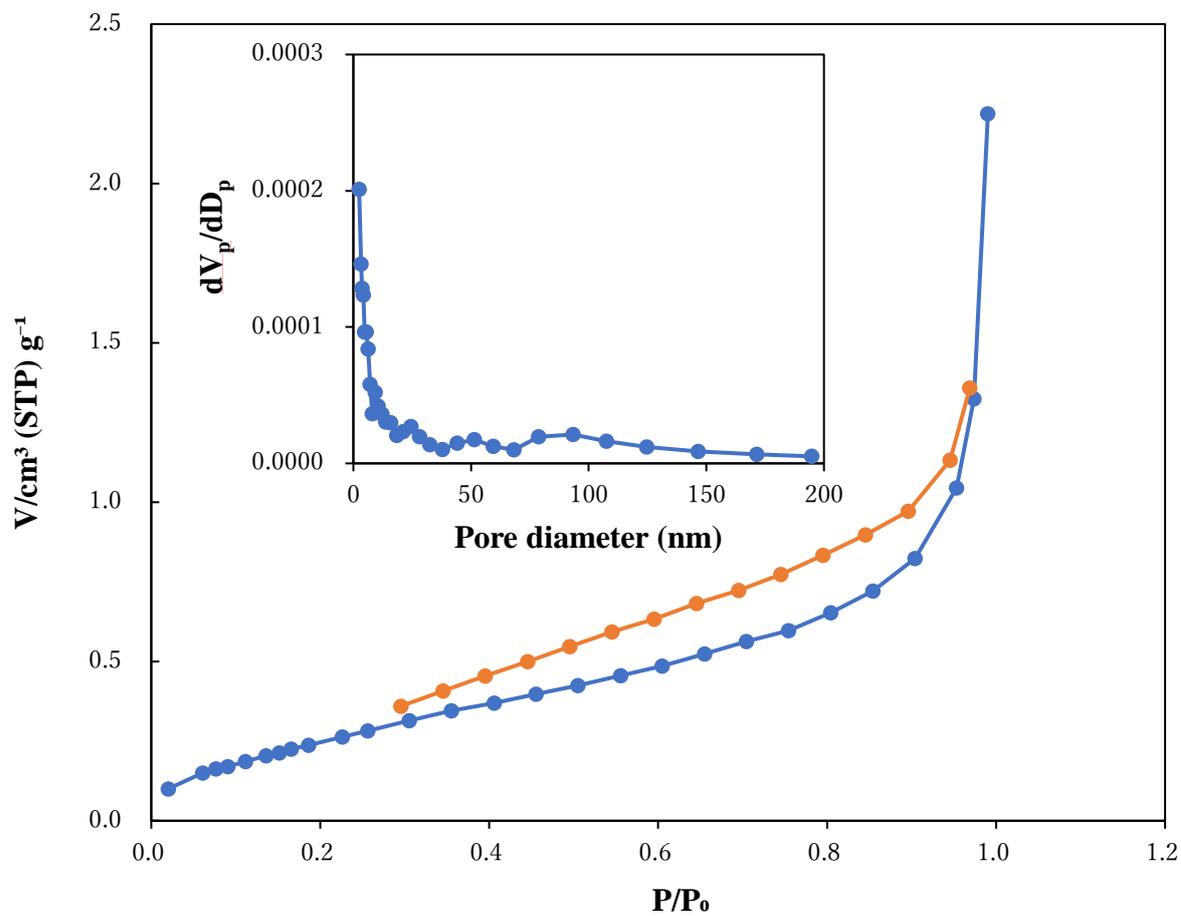
## 3-2-5 BET 法



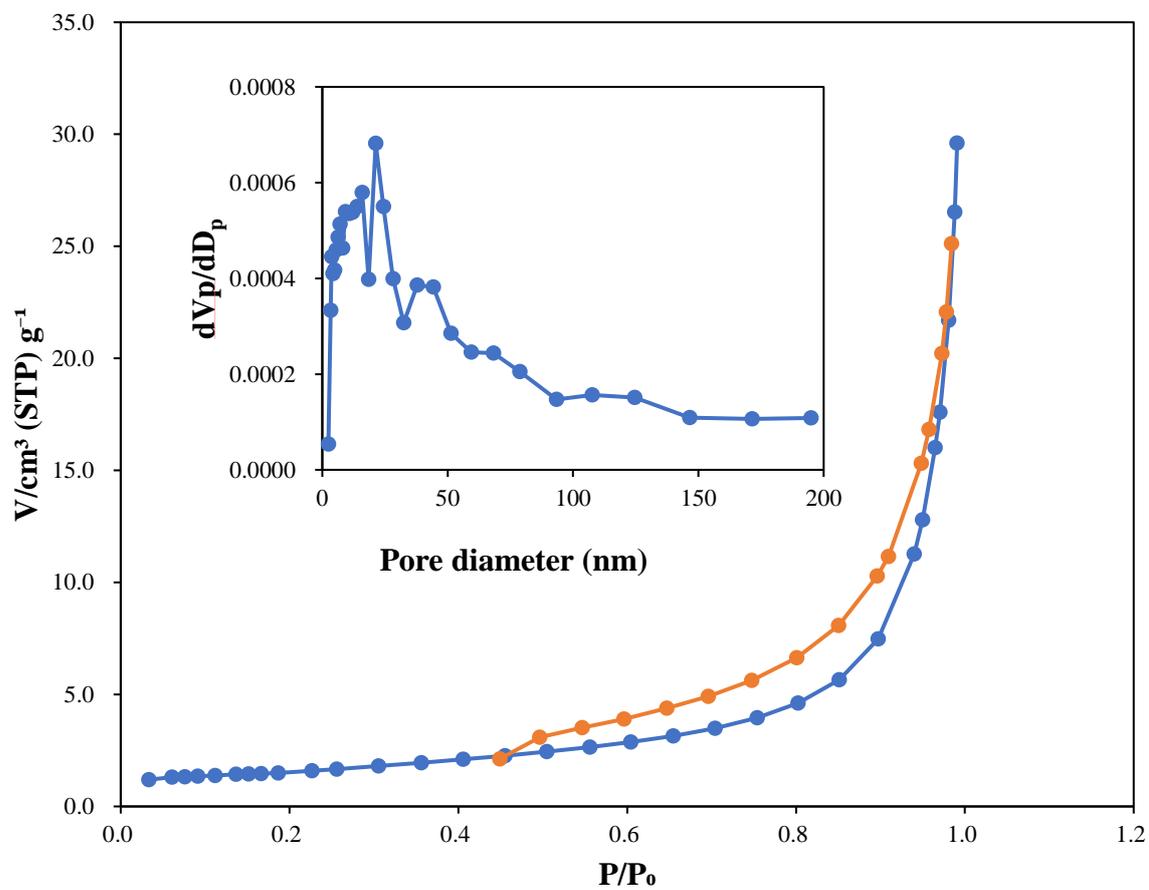
**Fig. 20.** N<sub>2</sub>-adsorption-desorption isotherms and pore size distribution curves of CuO (Cu<sub>0.059</sub>).



**Fig. 21.** N<sub>2</sub>-absorption-desorption isotherms and pore size distribution curves of CuO (Cu<sub>0.059</sub>P<sub>2.3</sub>).



**Fig. 22.** N<sub>2</sub>-adsorption-desorption isotherms and pore size distribution curves of Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu<sub>0.117</sub>MP1.15).



**Fig. 23.** N<sub>2</sub>-adsorption-desorption isotherms and pore size distribution curves of Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO (Cu<sub>0.117</sub>M).

**Table 1.** BET surface areas, pore volumes and pore sizes of different samples.

Sample	$V_m$ ( $\text{cm}^3$ (STP)) $\text{g}^{-1}$ )	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Pore volume ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	Pore size (nm)
CuO (Cu0.059)	0.06	0.26	$2.83 \times 10^{-3}$	43.3
CuO (Cu0.059P2.3)	0.14	0.60	$2.82 \times 10^{-3}$	18.8
CuO (Cu0.117MP1.15)	0.25	1.09	$3.41 \times 10^{-3}$	12.5
Cu/Cu <sub>2</sub> O/CuO (Cu0.117M)	1.25	5.44	$4.43 \times 10^{-3}$	32.6

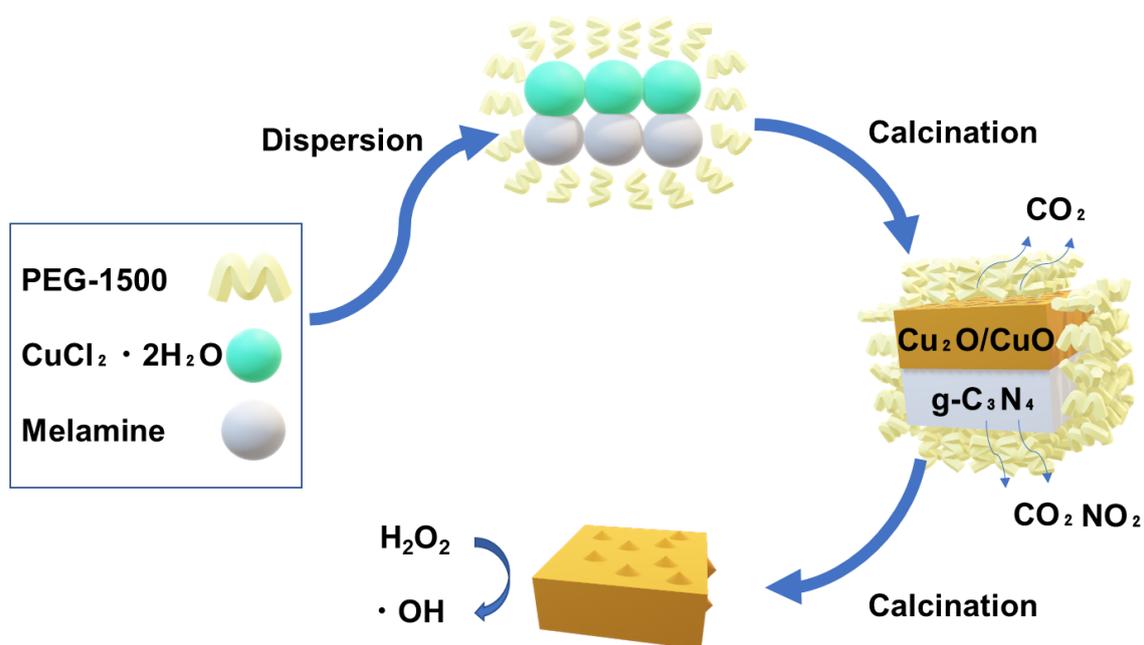
CuO (Cu)と比較して、CuO (CuP)の細孔サイズは小さく、比表面積、 $V_m$  は大きい値であった。細孔容積の値だけはほとんど変わらなかった。BJH 法では、CuO (CuP)の細孔直径が CuO (Cu)よりも小さいことが分かる。このことから CuO (CuP)は CuO (Cu)よりも PEG の影響で粒計が細かくなっており、その影響で細孔直径は小さくなっていると考えられる。

Fig. 23 の Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO (CuM)では、焼成時にメラミンからできるグラファイト状窒化炭素が混合していたため、 $V_m$ 、比表面積、細孔容積、細孔直径のすべてが酸化銅と比較してはるかに高い値となった。

Cu<sub>2</sub>O/CuO (CuMP1.15)は、CuO (Cu)と CuO (CuP)よりも  $V_m$ 、比表面積、全細孔容積は大きく、細孔サイズは小さい結果が得られた。また、BJH 法でも、2nm から 20nm の細孔直径の粒子が CuO (Cu)と CuO (CuP)よりも増えていることが分かる。XPS よりグラファイト状窒化炭素は生成物に含まれていなかったことから、酸化銅自体の粒計が Melamine と PEG によって細かくなっていると思われる。このことから、メラミンにより生成する酸化銅ナノシートは、通常の酸化銅よりも優れた表面積をもち、メソポーラス構造を有しているため、ペルオキシダーゼ様活性が高くなっていることが考えられる。

### 3-2-6 $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$ ナノシートの合成メカニズム

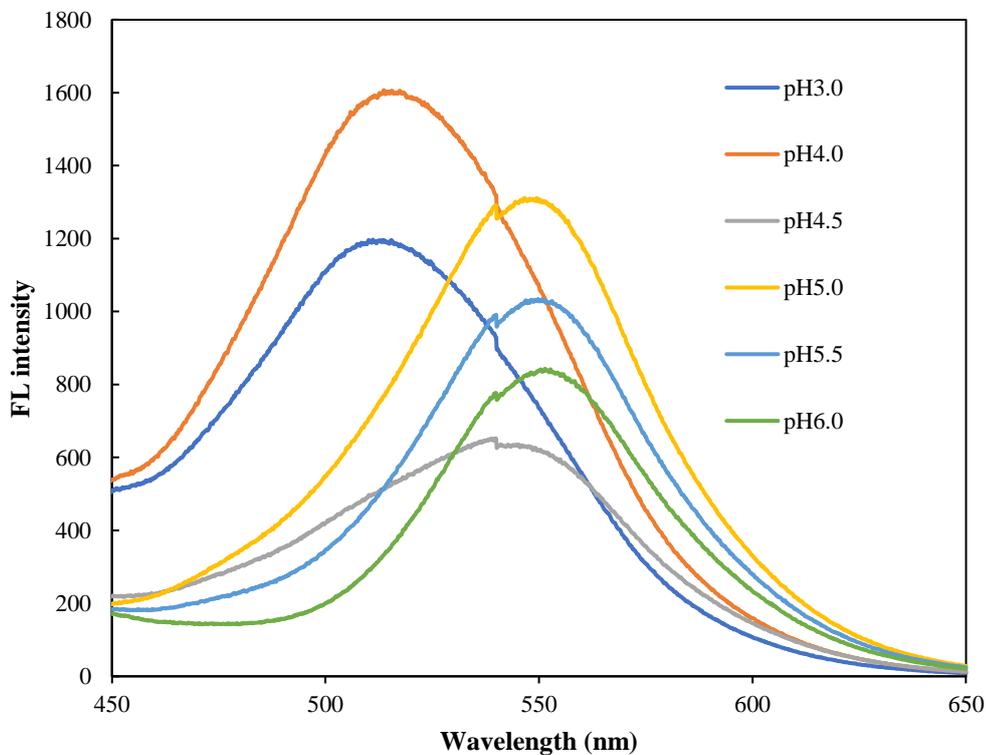
特性評価によって以下の合成過程が考えられる (Scheme. 2)。 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、PEG-1500、Melamine をエタノールで分散させたとき、Melamine と  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  は吸着し、PEG-1500 がその周りを覆う。次に焼成過程で、Melamine は酸化銅と反応し、還元反応を起こし一価の酸化銅と二価の酸化銅が生成する。一方でメラミンからグラファイト状窒化炭素も一緒に生成し、一価の酸化銅と二価の酸化銅と窒化炭素の二層構造を発生する。焼成を続けると、PEG と窒化炭素は反応し、窒化炭素は二酸化炭素や窒素酸化物となつてなくなる。結果、一価の酸化銅と二価の酸化銅のでこぼこしたシートを生成することができると思われる。



Scheme. 2. Synthesis of  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  nanosheet.

## 第4章 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定量

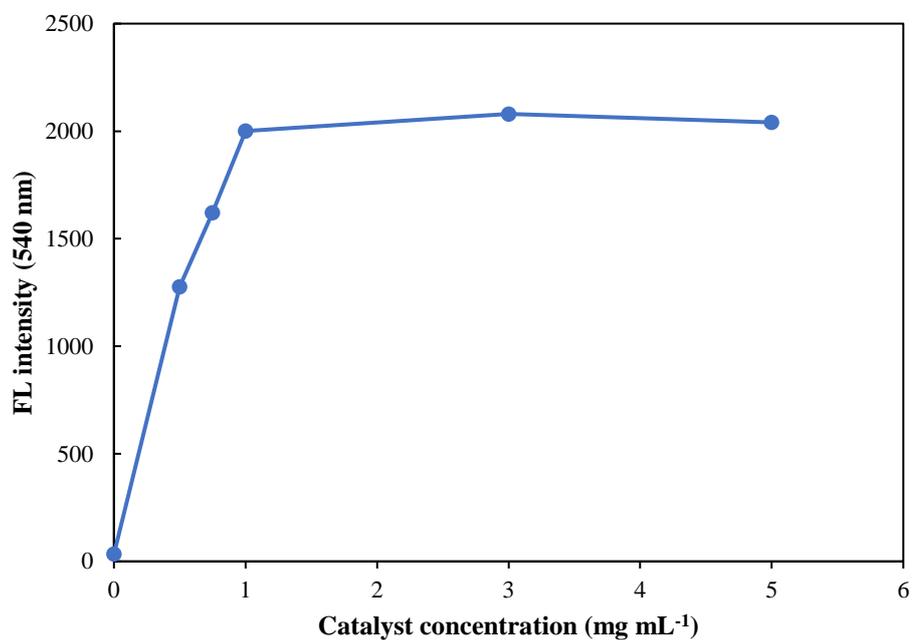
### 4-1 pH 条件の最適化



**Fig. 24.** Fluorescence emission spectra at 350 nm excitation for comparison of peroxidase-like activities by different pH condition.

OPD の酸化物として生成する DAP は、励起波長 (350 nm) のとき、540 nm 付近にピークが観測されることが知られている。しかし、実際に pH を変化させて実験を行った際に、蛍光波長のピークがシフトすることが分かった。そのため、本研究では、540 nm 付近で最も蛍光強度の高い pH5.0 を最適条件として、過酸化水素、グルコース定量の実験を行った。

## 4-2 系内の触媒濃度の最適化



**Fig. 25.** Intensity (540 nm) for each sample with different catalyst concentrations.

0 - 1.0 mg/mL までは、蛍光強度の増加が見られたが、1.0 mg/mL 以上に触媒濃度を濃くしても蛍光強度の増加は見られなかった。そのため、1.0 mg/mL の触媒濃度を実験の最適条件とした。

## 4-3 過酸化水素の検量線

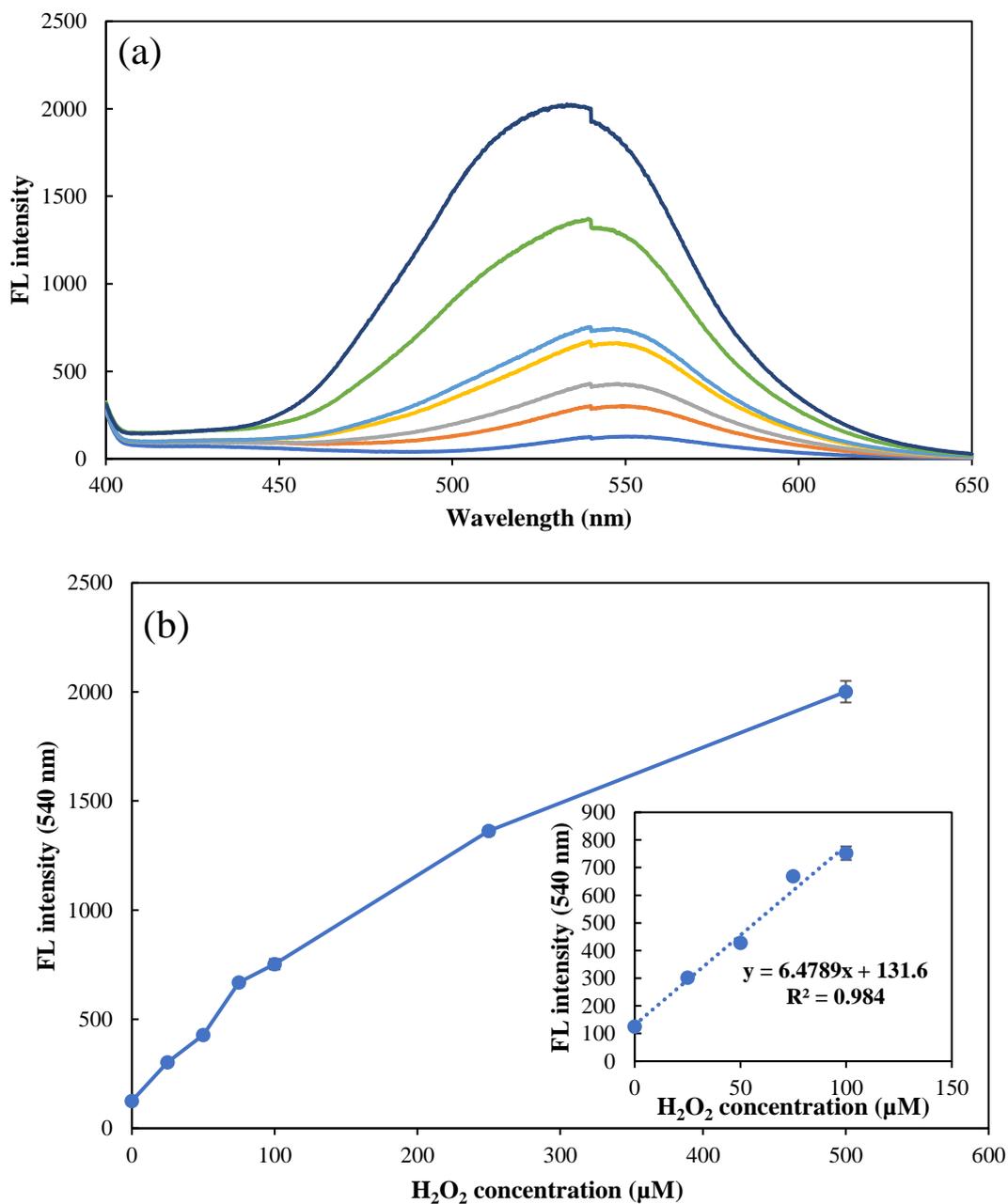
Fig. 26. Detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Fig. 18 (a) では、過酸化水素の濃度を濃くしていくと蛍光強度が増加していくことが分かる。Fig. 18 (b) は 540 nm の蛍光強度をプロットした結果である。Fig. 18 (c) では、0 - 100 μM で直線関係が見られた。このときの相関係数は 0.984 であった。検出限界 (LOD) は 0.42 μM であった。

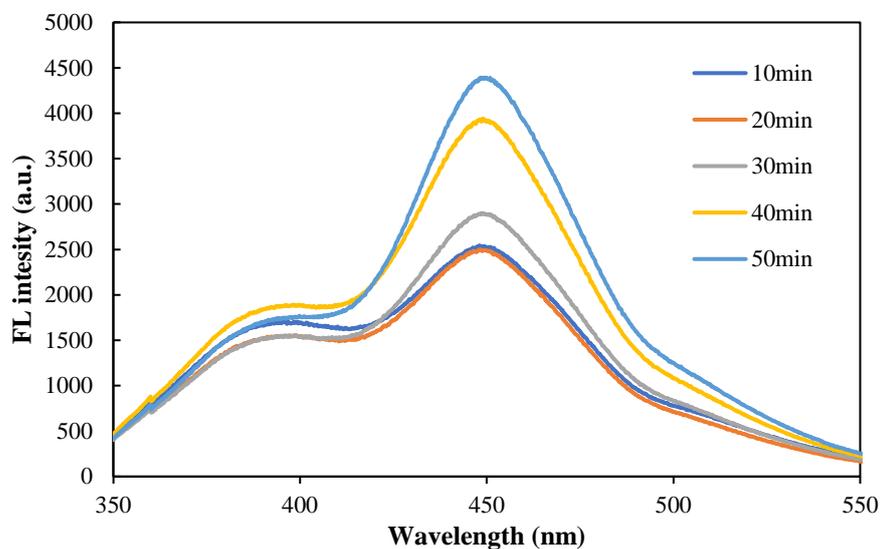
## 4-4 結果の比較

**Table. 1.** Comparison of different nanomaterial-based nanozymes as the sensing platform for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Sample	method	Linear range (μM)	LOD (μM)	Reference
Cu <sub>2</sub> O/CuO NPs	Fluorometric	0 - 100	0.42	this work
MoS <sub>2</sub> QDs/g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	Colorimetric	2 - 50	0.02	<a href="#">17</a>
PAN-CuO	Colorimetric	0.5 - 125	0.12	<a href="#">18</a>
GQDs/CuO nanocomposites	Colorimetric	0.5 - 10	0.17	<a href="#">19</a>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> NSs	Colorimetric	1 - 40	0.3	<a href="#">20</a>
g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> dot	Colorimetric	1 - 100	0.4	<a href="#">21</a>
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> NPs	Colorimetric	1 - 30	0.43	<a href="#">22</a>
Reduced Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Colorimetric	1 - 500	1	<a href="#">23</a>
CuO-g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	Colorimetric	2 - 150	1.2	<a href="#">24</a>
mesoporus CuO hollow sphere	Colorimetric	10 - 200	2.1	<a href="#">25</a>
PDI-CuO	Colorimetric	3 - 30	2.38	<a href="#">26</a>
Cu <sub>2</sub> O-MMT	Colorimetric	3 - 80	2.395	<a href="#">27</a>
CuO NPs	Colorimetric	2.5 - 200	2.5	<a href="#">28</a>
CuO:GNS composite	Colorimetric	100 - 800	78	<a href="#">29</a>
HRP	Colorimetric	1 - 60	1	<a href="#">30</a>

本法で合成した Cu<sub>2</sub>O/CuO の検出限界(0.42 μM)と線形範囲(0 – 100 μM)を他の報告と比較した(Table. 1.)。V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> NPs や PAN-CuO と遜色ない結果であることが分かった。現在、CuO を使った H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の検出法は多く報告されており、本法の結果から、今後は、Cu<sub>2</sub>O と CuO の複合体を使った新しい検出法の開発が進むことが期待できる。

## 4-5 クマリン(Coumarin)によるラジカル捕捉実験

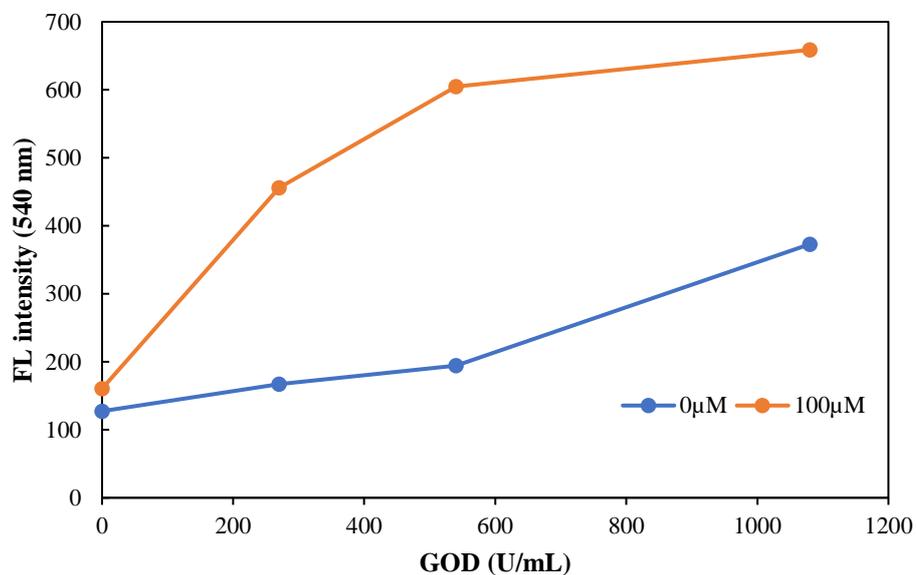


**Fig.27.** Fluorescence spectra observed during peroxidase-like activity of  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  nanosheet.

$\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  ナノシートと過酸化水素による反応でヒドロキシラジカルが生成するか調べた。Coumarin からヒドロキシラジカルによって生成する 7-Hydroxycoumarin は励起波長 315 nm、蛍光波長 540 nm に観測された。時間変化で蛍光波長を調べていくと蛍光ピークの強度が増加していく様子が見られた。このことから、過酸化水素と  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  ナノシートからヒドロキシラジカルが生成しており、ヒドロキシラジカルによって OPD から DAP が生成すると思われる。

## 第5章 グルコース定量

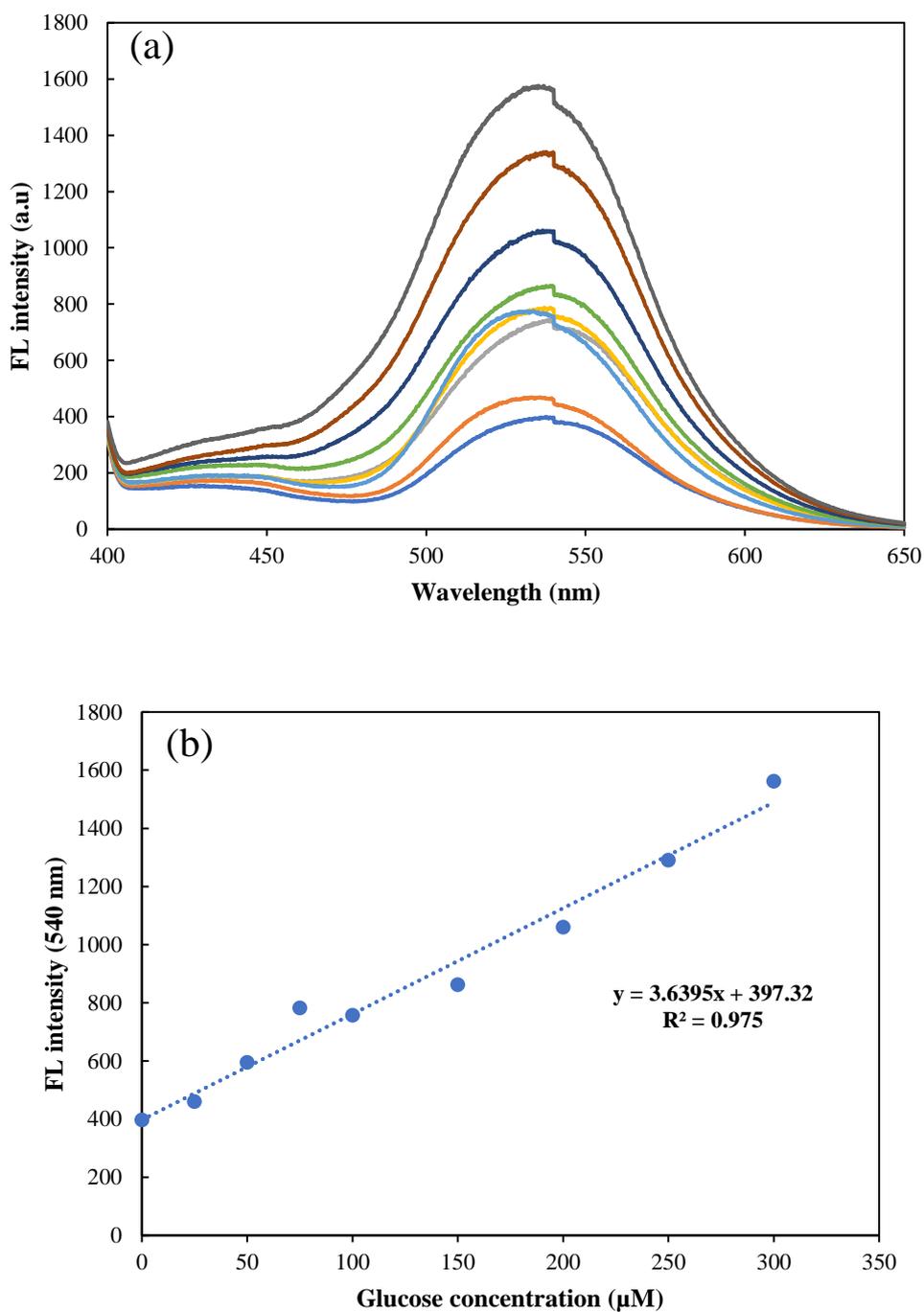
### 5-1 グルコースオキシダーゼ (GOD) の濃度 (U/mL) の最適化



**Fig. 28.** Optimization of GOD (U/mL).

蛍光強度の差が最も大きい時が、540 U/mL のときであった。そのため、540 U/mL を GOD の最適濃度とした。

## 5-2 グルコースの検量線

**Fig. 29.** Detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

0 - 300 μM のグルコース濃度で直線関係が見られた。このときの相関係数は 0.975 であった。検出限界 (LOD) は 9.22 μM であった。

## 5-3 結果の比較

**Table. 2.** Comparison of different nanomaterial-based nanozymes as the sensing platform for glucose.

Sample	method	Linear range ( $\mu\text{M}$ )	LOD ( $\mu\text{M}$ )	Reference
$\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$	Fluorometric	0-300	9.22	this work
GQDs/ $\text{CuO}$ nanocomposites	Colorimetric	2-100	0.59	<a href="#">19</a>
$\text{Cu}_{0.89}\text{Zn}_{0.11}\text{O}$	Colorimetric	0.025-0.5	1.5	<a href="#">31</a>
$\text{CuO-Au}$ nanoalloys	Colorimetric	0.0-30	6.75	<a href="#">32</a>
$\text{CuO}$ NPs	Colorimetric	10-300	10	<a href="#">28</a>
HRP	Colorimetric	20-100	278	<a href="#">33</a>

既存の天然酵素である HRP と  $\text{CuO}$  NPs よりも低い検出限界の値が得られた。また、 $\text{CuO}$  NPs よりも広い範囲で直線関係が得られた。これは、 $\text{Cu}_2\text{O}$  を入れたことが効果的であったといえる。

## 5-4 実試料の測定

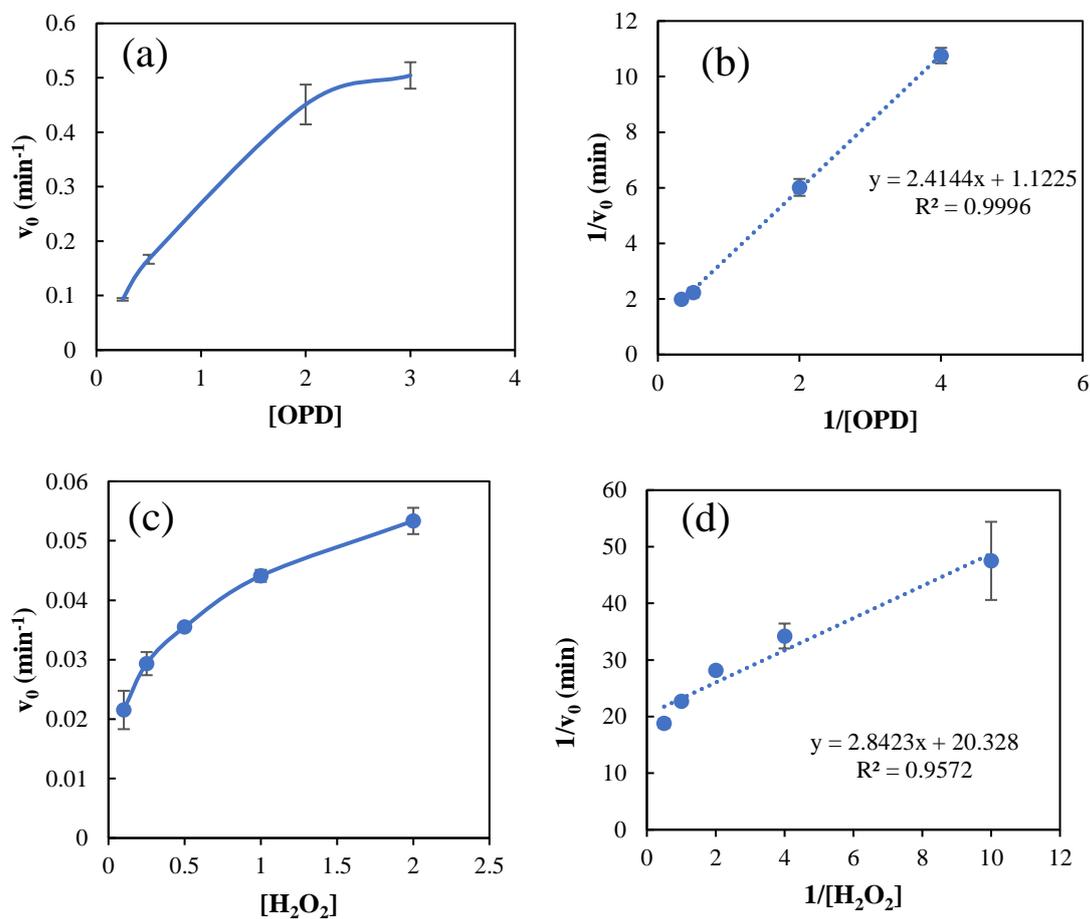
**Table.3.** Deteramination of glucose Levels in human serum samples.

Serum samples	Certified value (mM)	Found (mM)	error (%)	R.S.D. (%) (n = 3)
1	4.17	6.23±0.01	13.83	0.08
2	5.84	9.03±0.46	19.06	5.12
3	11.31	12.27±2.01	4.36	16.41

各試料は 100 倍希釈して、実験に用いた。試料の認証値と測定値の値が大きくずれていた。

## 第6章 速度論的分析

### 6-1 西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)の速度論的分析

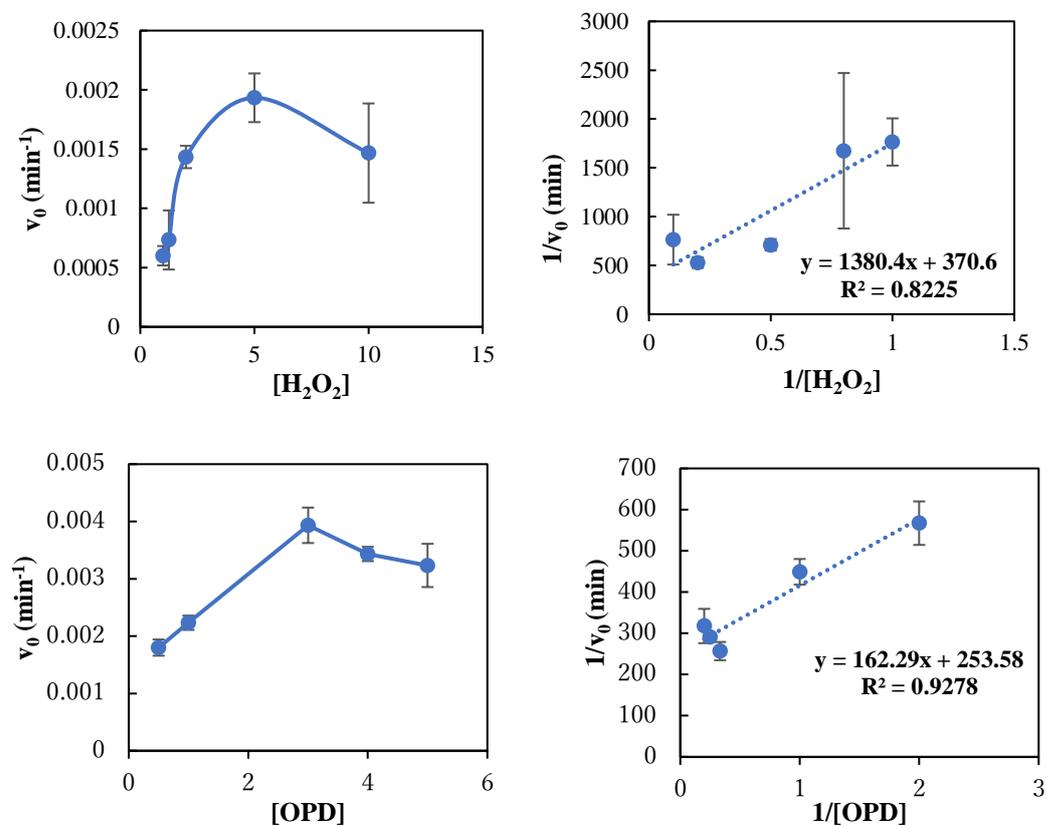


**Fig. 30.** Steady state kinetic analysis of HRP. The velocity of the reaction was measured using  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  HRP in  $0.1 \text{ M}$  acetate buffer. The concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was  $5 \text{ mM}$ , and the OPD concentration was varied (a). The concentration of OPD was  $0.5 \text{ mM}$  and the OPD concentration was varied (c) Double reciprocal plots of activity of HRP with the concentration of one substrate ( $\text{H}_2\text{O}_2$  or OPD) fixed and the other varied (b and d).

**Table.4.** Km and Vmax of reference.

Sample	Substrate	Km (mmol L <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (mol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Reference
HRP	OPD	2.15	14.8 × 10 <sup>-6</sup>	this work
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.14	8.2 × 10 <sup>-8</sup>	
HRP	OPD	0.31	4.55 × 10 <sup>-8</sup>	<a href="#">34</a>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.4	7.12 × 10 <sup>-8</sup>	
HRP	TMB	100	5.714 × 10 <sup>-8</sup>	<a href="#">31</a>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	14.28	1.33 × 10 <sup>-8</sup>	

HRPの最大反応速度(V<sub>max</sub>)とミカエリス・メンテン定数(K<sub>m</sub>)は、ミカエリス・メンテンの式とラインウェーバーバークプロットから求めた。得られたK<sub>m</sub>とV<sub>m</sub>の値は、文献値に近い値であった。誤差の原因として、攪拌や温度、実験時に用いた基質濃度の影響等が考えられる。

6-2  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  の速度論的分析

**Fig. 31.** Steady state kinetic analysis of  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  nanosheet. The velocity of the reaction was measured using 1.0 mL<sup>-1</sup>  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  nanosheet in 0.1 M acetate buffer. The concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was 5 mM, and the OPD concentration was varied (a). The concentration of OPD was 0.5 mM and the  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration was varied (b). Double reciprocal plots of activity of HRP with the concentration of one substrate ( $\text{H}_2\text{O}_2$  or OPD) fixed and the other varied (b and d).

**Table.4.** Km and Vmax of reference.

sample	Substrate	Km (mmol L <sup>-1</sup> )	Vmax (mol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Refference
Cu <sub>2</sub> O/CuO	OPD	0.64	$6.57 \times 10^{-8}$	this work
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.72	$44.9 \times 10^{-8}$	
Zn-CuO	TMB	0.01	$2.877 \times 10^{-8}$	<a href="#">31</a>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.071	$0.3 \times 10^{-8}$	
CuO	TMB	0.025	$10.49 \times 10^{-8}$	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.4	$16.1 \times 10^{-8}$	
Cu <sub>2</sub> O-MMT	TMB	0.09196	$13.08 \times 10^{-8}$	<a href="#">27</a>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.66	$0.38 \times 10^{-8}$	
CQDs/CuO	TMB	0.32	$8.01 \times 10^{-8}$	<a href="#">19</a>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.098	$3.2 \times 10^{-8}$	
Cu <sub>2</sub> O NWMCs	OPD	0.47	$5.54 \times 10^{-8}$	<a href="#">34</a>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	242	$4.30 \times 10^{-8}$	

6-3 HRP と Cu<sub>2</sub>O/CuO の速度論的分析結果の比較**Table.5.** Comparison of Km and Vmax

Sample	OPD		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Reference
	Km (mmol L <sup>-1</sup> )	Vmax (mol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Km (mmol L <sup>-1</sup> )	Vmax (mol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
HRP	2.15	14.8 × 10 <sup>-6</sup>	0.14	8.2 × 10 <sup>-8</sup>	this work
Cu <sub>2</sub> O/CuO nanosheet	0.64	6.57 × 10 <sup>-8</sup>	3.72	4.50 × 10 <sup>-8</sup>	this work
Cu <sub>2</sub> O NWMCs	0.47	5.54 × 10 <sup>-8</sup>	242	4.30 × 10 <sup>-8</sup>	<a href="#">34</a>

HRP よりも OPD の Km は低く、Cu<sub>2</sub>O/CuO nanosheet の OPD への親和性が高いことがわかった。また、Cu<sub>2</sub>O NWMCs よりも過酸化水素の Km ははるかに低く、Cu<sub>2</sub>O/CuO nanosheet の過酸化水素への親和性が高いことがわかった。

## 第7章 結論

本研究では、PEG と Melamine を用いた新しい合成法で  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  ナノシートの合成に成功した。合成した  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  ナノシートは、PEG だけで合成した酸化銅、Melamine だけで合成した酸化銅、市販の酸化銅よりもペルオキシダーゼ様活性が高くなることが分かった。

XRD、SEM、TEM、XPS による特性評価を行った。XRD からペルオキシダーゼ様活性を高める要因として、 $\text{Cu}_2\text{O}$  と  $\text{CuO}$  の二つが存在することで、ヒドロキシラジカル生成のサイクルがスムーズになることが考えられる。SEM、TEM による特性評価より、PEG には酸化銅の表面を荒くし、Melamine にはシート状の酸化銅の形成する効果があることが分かった。Melamine と PEG の両方を加えて合成した酸化銅では、Melamine によって酸化銅はシート状になりつつ、PEG によってシートが壊されることによって、酸化銅ナノシートを合成する。

$\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  (Cu0.117MP1.15)は、 $\text{CuO}$  (Cu0.059)と  $\text{CuO}$  (Cu0.059P2.3)よりも  $V_m$ 、比表面積、全細孔容積は大きく、細孔サイズは小さい結果が得られた。また、BJH 法でも、 $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  (Cu0.117MP1.15)では、2nm から 20nm の細孔直径の粒子が  $\text{CuO}$  (Cu0.059)と  $\text{CuO}$  (Cu0.059P2.3)よりも増えていることが分かる。

過酸化水素定量法に合成した  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  ナノシートを適用した。過酸化水素濃度 0 – 100  $\mu\text{M}$  の範囲で相関係数 0.984 の直線関係が見られた。検出限界は 0.42  $\mu\text{M}$  であった。得られた検出限界は、先行研究の  $\text{CuO}$  NPs や  $\text{Cu}_2\text{O}$ -MMT よりも優れていた。

グルコース定量法では、グルコース濃度 0 – 300  $\mu\text{M}$  の範囲で相関係数 0.975 の直線関係が見られた。検出限界は 9.22  $\mu\text{M}$  であった。 $\text{CuO}$  NPs の検出限界よりもわずかに低い結果が得られた。

速度論的分析実験では、 $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  ナノシートは、OPD に対して HRP よりも親和性を持ち、過酸化水素に対しては先行研究の  $\text{Cu}_2\text{O}$  NWMCs よりも親和性が高いという結果が得られた。

今後、 $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  ナノシートを用いた過酸化水素及びグルコース定量法の実用化と新たな  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$  コンポジットの開発が期待される。

## 参考文献

1. S. Tanaka, H. Oishi, *光学* 33(7), (2004) 392-397.
2. W. Deng, Y. Peng, H. Yang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* (2019) 29072-29077
3. L. Wu, G. W, N. Hu, Z. He, *Nanomaterials* 8 (7) (2018)
4. S. Yakubu, J. Xiao, J. Gu, J. Cheng, *Sensor&Actuators; B. Chemical* 325 (2020) 128909.
5. X. Wang, L. Qin, M. Zhou, *Anal. Chem.* 90 (2018) 11696-11702.
6. A. Afmed, P. John, M. H. Nawaz, *ACS Appl. Nano Mater.* 2 (2019) 5156-5168.
7. K. Kim, K. N. Chaudhari, S. Kim, *Journal of industrial and Engineering Chemistry* 95 (2021) 388-396.
8. M. X. Liu, H. Zhang, S. Chen, Y. L. Yu, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 4 (2021)
9. R. Javed, M. Ahmed, I. U. Haq, S. Nisa, *Material Science and Engineering C* 79 (2019) 108-115
10. Y. Lian, Y. Wang, D. Zhang, L. Xu, *Colloids and Surfaces A* 626 (2021) 127010
11. X. Zheng, Q. Lian, L. Zhou, Y. Jiang, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 9 (2021) 7030-7043.
12. J. Lee, G. S. Park, S. T. Kim, M. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed* 52 (2013) 1026-1030.
13. F. Cheng, C. He, D. Shu, *Materials Chemistry and Physics* (2011) 268-273.
14. S. L. Wang, P. G. Li, H. W. Zhu, *Powder Technology* 230 (2012) 48-53.
15. Mark C. Biesinger, *Surf. Interface Anal.* 49 (2017) 1325-1334.
16. R. Wang, Z. Li, *Chinese Journal of Catalysis* 35 (2014) 134-139.
17. F. Qiao, Q. Qi, Z. Wang, K. Xu, *Sensors and Actuators B* 229 (2016) 379-386.
18. X. Zheng, Q. Lian, L. Zhou, Y. Jiang, *ACS Sustainable Chem. Eng.* (2021) 7030-7043.
19. L. Zhang, X. Hai, C. Xia, X. Chen, *Sensors and Actuators B* 248 (2017) 374-384.
20. J. Chen, Q. Chen, J. Chen, *Microchim Acta* 183 (2016) 3191-3199.
21. S. Liu, J. Tiam, L. Wang, *RSC Adv* 2 (2012) 411-413.
22. J. Sun, C. Liu, Y. Qi, S. GuO, *Sensors* 16 (2016) 584.
23. J. Lu, H. Zhang, S. Li, S. GiO, *Inorg. Chem.* 59 (2020) 3152-3159.
24. J. Zhu, W. Nie, Q. Wang, *Carbon* 129 (2018) 29-37.
25. D. Cheng, J. Qin, Y. Feng, *Biosensor* 11 (2021) 258.
26. M. Chen, Y. Ding, Y. Gao, *RSC Adv.*, 7 (2017) 25220-25228.
27. S. Lian, L. Gao, M. Chen, *Appl Organometal Chem.* 33 (2019) e4716.

28. L. Wang, J. Hou, S. Liu, *Sensors and Actuators: B. Chemical* 287 (2019) 180-184
29. V. Sharma, S. M. Mobin, *Sensors and Actuators B* 240 (2017) 338-348
30. E. Pick, Y. Keisari, *Journal of Immunological Methods* 38 (1980) 161-170
31. A. P. Nagvenkar, A. Gedanken, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8 (2016) 22301-22308
32. S. Mvango, P. Mashazi, *Materials Science and Engineering C* 96 (2019) 814-823.
33. N. Tank, Suman and C S Pundeir, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 42 (2005) 391-394
34. G. L. Li, P. Ma, Y. F. Zhang, *J Mater Sci* 51 (2016) 3979-3988.

## 学会発表

1. “酸化銅のペルオキシダーゼ様活性を利用する過酸化水素の定量法”, 横井 嶺・勝又 英之・立石 一希・古川 真衣・金子 聡, 第 11 回 CSJ 化学フェスタ, P4-066 (2021).
2. “ペルオキシダーゼ様活性を有する酸化銅を用いた蛍光定量法の開発”, 横井 嶺・勝又 英之・立石 一希・古川 真衣・金子 聡, 第 51 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, A4a 01 (2021).
3. “ペルオキシダーゼ様活性を有する化合物の合成とその過酸化水素の定量法への応用” 横井 嶺・勝又 英之・立石 一希・古川 真衣・金子 聡, 日本分析化学会 第 70 年会, A1104 (2021).
4. “Fluorometric Determination of  $\text{H}_2\text{O}_2$  Using Cu-Based Catalysts with Peroxidase-like Activity”, R. Yokoi, H. Katsumata, I. Tateishi, M. Furukawa, S. Kaneco, The 11<sup>th</sup> IS<sup>2</sup>EMU 2020, F-34.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導頂きました金子聡教授、勝又英之准教授、立石一希助教、古川真衣技官の諸先生方には、多大なご協力心から感謝致します。

そして、研究生活で大変お世話になりました Mahumudul Hassan Suhag 氏、Aklima Khatun 氏、M2 の岩本大地氏、桑原周平氏、後藤拳斗氏、佐藤和俊氏、菅沼康太氏、杉浦恵里紗氏、高木雅也氏、矢野有紗氏、、M1 の柿内智樹氏、川口悟志氏、小林巧実氏、阪祐治氏、佐藤元紀氏、柴田舞子氏、高井祐汰氏、藤原崇行氏、郭斌氏、学部4年生の今村萌花氏、大西彩太氏、川上将太郎氏、川戸すみれ氏、菊池健太氏、黒須美里氏、高木丈誌氏、野口恵伍氏、松井くるみ氏に深く感謝致します。

最後に、学生生活を支えていただき、常に温かく見守っていただいた家族に深く感謝致します。ありがとうございました。