

## 論文の内容の要旨

氏名：林 智久

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：導電性ダイヤモンド電極による糖関連化合物の検出過程の解明及び分析法への応用

【目的】糖関連化合物は、食品や生体成分に普遍的に存在し、エネルギー源や生体構成成分として重要な化合物であるとともに、健康食品や医薬品等においても利用例は多く、そのため多くの検出法が検討され提案されている。糖関連化合物に関する検出法には、誘導体化した後、蛍光検出、UV 検出、電気化学検出する方法や、還元糖をそのまま電気化学検出する方法が汎用されている。しかし、煩雑な操作、試験条件の制限、電極の安定性等に問題があり、簡便かつ高感度な検出法が要求されている。導電性ダイヤモンド電極である boron-doped diamond (BDD) は、ホウ素を高濃度でドーピングしたダイヤモンド電極であり、広い電位窓を持ち、バックグラウンド電流が低く、電極の安定性が高いなど様々な利点を持ち、電気化学分野で幅広い研究がなされている。これまでの研究において、BDD 電極の特徴を生かした 2 V 付近の高電位で電解酸化し、糖関連化合物の検出法としての可能性について検討してきた。しかし、BDD 電極表面上での糖関連化合物の検出過程における電解酸化反応について探索した報告は未だない。本研究では、サイクリックボルタムメトリー、ヒドロキシラジカルの定性反応及び電解酸化反応を用いて、電極表面上での反応の探索を行った。また、その応用として、糖消化酵素である  $\alpha$ -amylase の酵素反応及び酵素反応阻害物質探索の分析法開発を行った。

### 【方法・結果・考察】

#### 1. サイクリックボルタムメトリー

BDD 電極表面でのグルコースの電解酸化反応のメカニズムについて、サイクリックボルタムメトリーを用いて検討した。試料にはリン酸カリウム緩衝液 (pH 4.5) 中にグルコースを添加したものを用いた。サイクリックボルタムメトリーの測定より、グルコースの酸化電位を得る事はできなかった。しかしながら、2 V 付近において、グルコースの添加濃度に応じた酸化電流値の増加を確認する事ができた。(Fig. 1) また、サイクリックボルタムグラム形状は、BDD 電極表面においてグルコースは酸化還元反応が可逆的でも不可逆的でもない事がわかった。次に、緩衝液 pH とブランクからの立ち上がりの酸化電位をプロットした結果、緩衝液 pH が酸性側より pH 7 に向けて酸化電位が減少し、pH 7 より塩基性側に向けては一定の酸化電位を示した。これらの pH-電位プロットは、水の電気分解の際に示す傾向であり、BDD 電極表面でも水の電気分解が起こっている事が推察された。BDD 電極で糖関連化合物が検出可能な理由として、電極表面において水の電気分解から生じたヒドロキシラジカルが糖関連化合物と酸化的に反応し、酸化電流値が発生するものと考えられた。

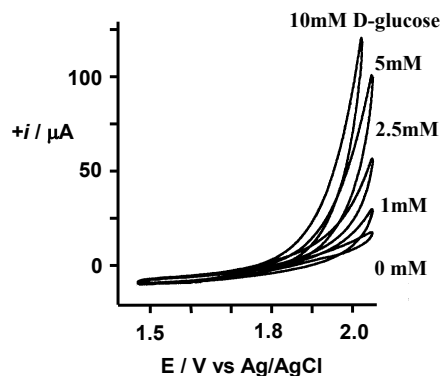


Fig.1 Cyclic voltammogram of glucose at BDD electrode

## 2. ヒドロキシラジカルの定性反応

BDD 電極表面におけるヒドロキシラジカルの生成を確認するために、coumarin を用いてヒドロキシラジカルの定性反応を実施した。Coumarin はヒドロキシラジカルと反応すると、7-hydroxycoumarin となる。Coumarin は励起波長 332 nm を照射させた場合、蛍光を示さない。一方、7-hydroxycoumarin は 460 nm 付近に蛍光を示す。この性質を利用し、リン酸カリウム緩衝液 (pH 4.5) 中に coumarin を添加し、2.0V vs Ag / AgCl で 60 分間電解酸化を実施後、反応前後の蛍光スペクトルを測定した。その結果、電解酸化後の coumarin 溶液の蛍光スペクトルは、7-hydroxycoumarin と同様のスペクトルを示した。(Fig. 2) この結果は、BDD 電極は 2 V 付近の定電圧とした際、電極表面にはヒドロキシラジカルが生成している事を示した。糖関連化合物の電解酸化においても、BDD 電極と分析対象物が直接反応しているのではなく、BDD 電極で水が電気分解して生じるヒドロキシラジカルが分析対象物に反応していると考えられる。また、予想される電極表面での電解酸化過程を Fig. 3 に示した。

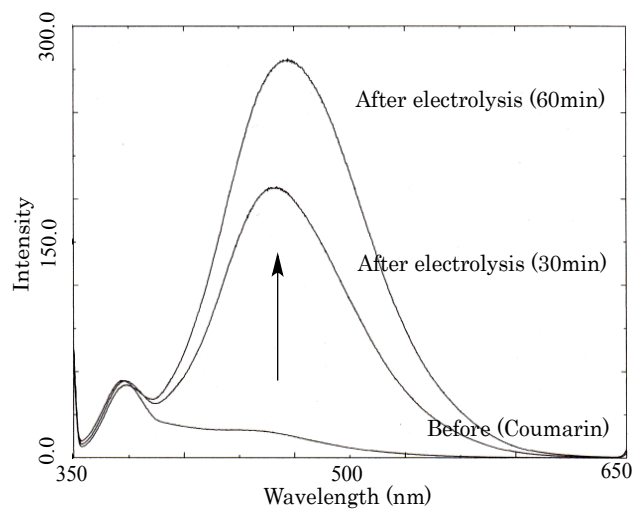


Fig. 2 The fluorescence spectrum of BDD electrode electrolysis of Coumarin

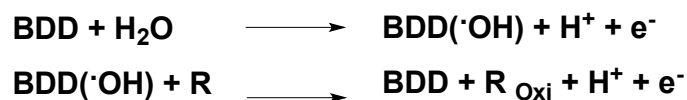


Fig. 3 Propose of reaction at the BDD electrode surface

### 3. 電解酸化反応

BDD 電極表面での糖関連化合物の検出過程は、水の電気分解由来のヒドロキシルラジカルと反応し、酸化電位を生じる事が考えられた。そのため、基質を用いての電解酸化反応を実施し生成物の同定を行った。探索に使用する基質として、代表的な糖誘導体である benzyl- $\alpha$ -D-glucose を使用した。benzyl- $\alpha$ -D-glucose を用いた理由としては、グルコースは難検出性の化合物であり、電解酸化反応後の生成物もグルコースの類縁物質である事が推察される。そのため、容易に検出可能な官能基を持つグルコース誘導体として、benzyl- $\alpha$ -D-glucose を基質として選択した。電解酸化反応は Flow Injection Analysis (FIA) の流路を用いて行い、FIA のキャリアー溶液は、リン酸カリウム緩衝液に基質を添加した溶液を使用した。電極には BDD 電極、対極にはステンレススチール、参照電極には銀・塩化銀電極を用い、各電極をポテンシostatに接続し、酸化電位を 2.0 V vs Ag/AgCl に固定し、1 週間電解反応させた。また、長時間の電解酸化反応に対応するため、FIA の廃液をキャリアー溶液にリサイクルさせた。電解酸化後に、得られた生成物については、HPLC での定性及び分離精製を行った。その結果、benzyl- $\alpha$ -D-glucose から分離精製できた生成物は、hydroquinone と oxalic acid であった。また、生成物の収率は、基質に対して、hydroquinone は、約 1.33% であり、oxalic acid は、約 0.83% であった。(Fig. 4) これらの事から、BDD 電極表面では、ヒドロキシルラジカルと基質が反応している事がわかった。さらに、収率が基質に比べて非常に少ないことから、ヒドロキシルラジカルと基質の反応は連続的に進行し、最終的には CO<sub>2</sub> になると考えられた。また、基質にグルコースを用いた電解酸化反応も同様に実験を行った結果、グルコースからも 0.32% のシュウ酸が得られた。そのため、糖関連化合物も BDD 電極表面で生成したヒドロキシルラジカルと反応しシュウ酸を生成する事がわかった。

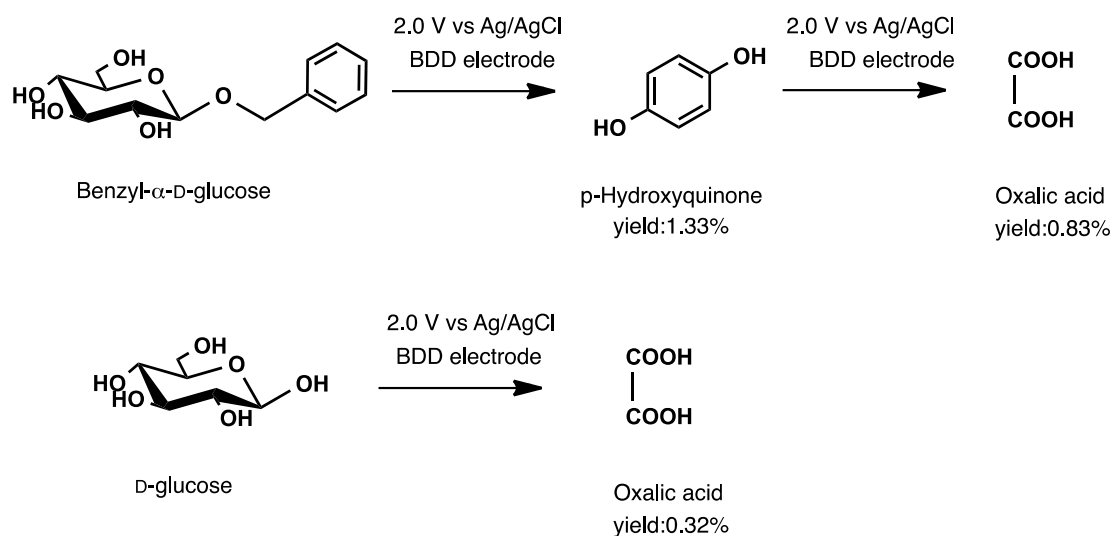


Fig. 4 Electrochemical oxidation of Benzyl- $\alpha$ -D-glucose and D-glucose at BDD electrode

#### 4. BDD 電極を用いた $\alpha$ -amylase 酵素反応及び酵素反応阻害物質探索の分析法開発

BDD 電極を用いた糖分析法の応用として、糖消化酵素である  $\alpha$ -amylase の酵素反応を実施した。蛍光ラベルで修飾された非天然型のマルトオリゴ糖は、 $\alpha$ -amylase の加水分解反応の基質として汎用されている。しかし、非天然型のマルトオリゴ糖は、その修飾基の影響により本来の  $\alpha$ -amylase の酵素反応を反映しないと考えられる。天然型のマルトオリゴ糖を基質として用いた分析法も報告はされているが、検出感度、選択性及び簡便性など十分に満足いく分析法ではないと考えられる。そのため、糖関連化合物が容易に検出可能な BDD 電極及び分離手法としての HPLC を組み合わせる事で、 $\alpha$ -amylase の酵素反応及び酵素反応阻害物質探索の分析法を開発した。酵素反応の基質にはグルコースが 5 分子繋がったマルトオリゴ糖 (maltopentaose (G5)) を使用した。 $\alpha$ -amylase の酵素反応の結果、基質の減少 (G5) と生成物の増加 (maltotriose : G3, maltose : G2) を確認することができた。(Fig. 5) 本分析法における検出感度は、基質濃度が  $50 \mu\text{M}$  であり十分満足いく検出感度が得られた。さらに、酵素反応阻害物質の探索として  $\alpha$ -amylase を阻害する糖尿病治療薬 acarbose を基質と共に添加し、基質と生成物を同様の方法で分析することにより、酵素阻害の薬学的評価を行った。その結果、acarbose は、 $\alpha$ -amylase を阻害し加水分解生成物の抑制を確認できた。また、Lineweaver-Burk plot から acarbose による  $\alpha$ -amylase の酵素阻害は、mixed non-competitive inhibitor であった。本分析法は、HPLC での分離検出を行っている事から、acarbose 以外の阻害物質の添加にも適用でき、 $\alpha$ -amylase の酵素反応及び酵素反応阻害物質の探索について、従来汎用されている非天然型の基質を用いた分析法より、利便性が向上したと考えられる。

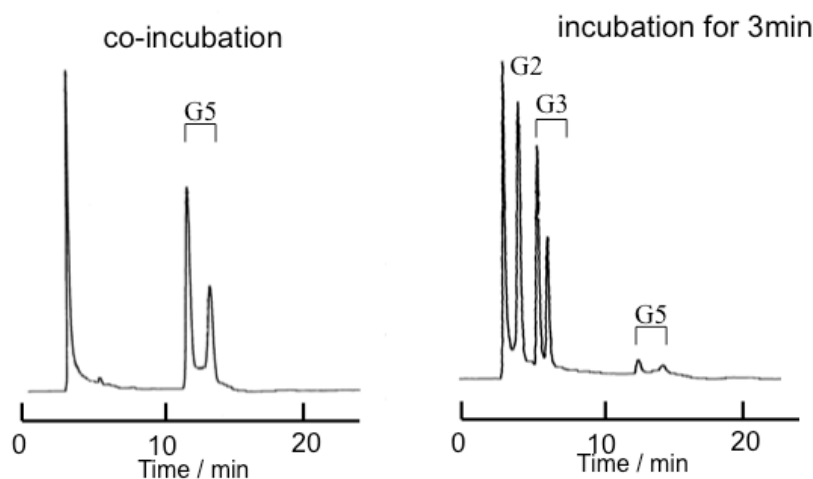


Fig. 5 Chromatographic of  $\alpha$ -amylase enzyme reaction of maltooligosaccharide

本報では、BDD 電極における糖関連化合物の検出過程は、分析対象物が電極表面のヒドロキシラジカルと反応し、酸化電流が生じる事を証明した。今後、電極表面上のヒドロキシラジカルを利用する事で糖関連化合物のみならず、その他の難検出性物質にも応用可能である事が示唆され、利用範囲の拡大が期待される。