

学位論文

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

日本大学薬学部
薬品分子化学研究室

林 智久

目次

序論	3
本論	9
第一章 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	9
1. ホウ素ドーパダイヤモンド (BDD) 電極を用いた サイクリックボルタムメトリー	9
1.1. 実験	
1.1.1. 試薬	
1.1.2. ホウ素ドーパダイヤモンド (BDD) 電極	
1.1.3. サイクリックボルタムメトリー装置	
1.2 結果及び考察	
1.2.1. サイクリックボルタムメトリーによる酸化電位の確認	
2. ヒドロキシラジカルの定性反応	19
2.1. 実験	
2.1.1. 試薬	
2.1.2. ヒドロキシラジカルの検出反応装置	
2.2 結果及び考察	
2.2.1. ヒドロキシラジカルの定性反応	
3. 糖関連化合物の電解酸化反応及び検出過程	23
3.1. 実験	
3.1.1. 試薬	
3.1.2. リサイクル FIA 流路装置	
3.2. 結果及び考察	
3.2.1. リサイクル FIA 流路を用いた Benzyl α -D-glucopyranoside の 電解酸化反応	

3.2.2. リサイクル FIA 流路を用いたグルコースの電解酸化反応
第一章 小活

第二章 BDD 電極を用いた糖関連化合物の
分析法への応用……………32

1. α -amylase の酵素反応への応用……………32

1.1. 実験

1.1.1. 試薬

1.1.2. α -アミラーゼの酵素反応及び BDD 電極を用いた HPLC

1.2. 結果及び考察

1.2.1. マルトオリゴ糖の標準溶液の分析

1.2.2. α -アミラーゼによるマルトオリゴ糖の酵素反応

1.2.3. α -アミラーゼの酵素阻害反応

第二章 小活

結語……………45

参考文献……………46

謝辞……………48

序論

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、医薬品にも多く利用されている。そのため、多くの分析法が検討されている¹⁾。糖関連化合物をそのままの形で高感度に検出する直接法や糖類を誘導体化した後検出する間接法を含め、電気化学検出法 (EC)、蒸発光散乱検出法 (ELSD)、UV 検出法 (UV)、蛍光検出法 (FL) 等が利用されている。

直接法としては、EC と ELSD が挙げられる。EC を利用したものには、酵素反応を組み合わせたものと糖関連化合物を電極酸化するものに大別される。

酵素反応を組み合わせた EC 法は、固定化したグルコースオキシダーゼ (GOx) を用いてグルコースを酸化し、同時に発生した過酸化水素を検出する方法²⁾が用いられている。この方法は、酵素を用いて検出するため、グルコースに対する選択性は高い。しかし、酵素反応には最適な反応条件あり、緩衝液や移動相などの分析条件を酵素反応条件に合わせる必要があると考えられる。また、固体電極に酵素を固定化するため、一定時間使用すると酵素の安定性が低下し、分析の再現性が得られないことも想定される。また、多成分の一斉検出への適用や未知の糖関連化合物の分析は難しいと考えられる。

電極酸化する EC 法は、Cu³⁾、Ni^{4),5)}、Pt^{6),7)}、Au^{6,7,8)}の金属電極を用いて、電気化学的に糖を電解酸化し生じた酸化電流をモニターする方法がある。特に、Pt 又は Au 電極とパルスアンペロモードを組み合わせ、電極表面を洗浄しながら検出する方法では、還元糖が高感度に検出可能である⁸⁾。

ELSD は移動相溶媒を蒸発除去した後、光散乱光を検出方法である。そのため、還元糖に限らず、全ての糖関連化合物が検出できる分析法である⁹⁾。しかし、その検出原理上、移動相に緩衝液の使用はできないため、pH を調整することはできず、必ずしも満足いくものではないと考えられる。

間接法として、UV、FL が使用されている。UV においては、*p*-ニトロベンジルオキシアミン¹⁰⁾、FL については、アルギニン¹¹⁾、2-アミノピリジン¹²⁾を用い誘導体化した後検出を行う方法などが報告されている。これらは、高感度に検出できる利点はあるものの、プレカラム法やポストカラム法など煩雑な誘導体化反応が要求される。

以上のように、糖関連化合物の分析法には、それぞれ長所と短所があり、還元糖、非還元糖及び糖鎖などのすべての糖関連化合物に適用可能な分析法の開発が必要であると考えられる。そのため、導電性ダイヤモンド電極を用いて、糖関連化合物の検出法について検討した。

導電性ダイヤモンド電極であるホウ素ドーパダイヤモンド (Boron-doped diamond : BDD) 電極は、電気化学分野および環境分野において注目されている¹³⁾。導電性ダイヤモンドとは、絶縁体であるダイヤモンドに導電性を付与した炭素電極である。BDD 電極は、バックグラウンド電流が少ない、電位窓が広い、電極表面への吸着が少ない、電極の安定性が高いなどダイヤモンドの構造を生かした利点がある¹³⁾。

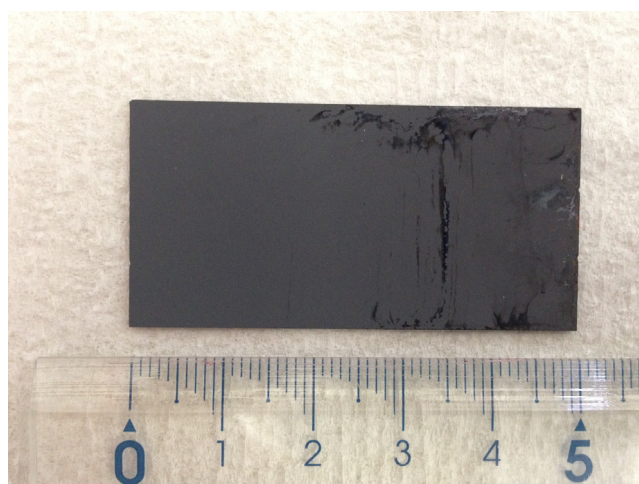


Fig.1 ホウ素ドーパダイヤモンド (BDD) 電極

例として、水素終端 BDD 電極では、D-グルコース¹⁴⁾やシュウ酸¹⁵⁾等を電極酸化反応によって検出している。しかし、水素終端 BDD 電極の長期にわたる安定性は、酸素終端 BDD 電極に比べて悪く、水素終端 BDD を長期に使用した場合、酸素終端 BDD に変わる可能性があるため、実際の分析を考慮すると満足いくものではない。また、BDD 電極の本来持つ広い電位窓の性質を生かしていないと考えられる。酸素終端 BDD 電極は正方向へ印加した際の電極の安定性が高く、尿酸¹⁶⁾、クロロフェノール¹⁷⁾、核酸塩基^{18,19)} etc など幅広く適用されている。しかし、BDD 電極の利点である 2.0V 付近の電位窓を検出に利用した例は見られ

ない。そのため、**BDD** 電極の広い電位窓を活用することで、従来用いられている金属電極では検出できない高電位での電解酸化反応が可能であると考えた。

筆者はこれまで、難電解性物質である糖関連化合物を、**2.0V** 付近の高電位で、電解酸化が可能であることを示し、糖関連化合物の検出法としての可能性を検討してきた。本研究では、フローセルタイプの **BDD** 検出器を作成した (Fig. 1)。

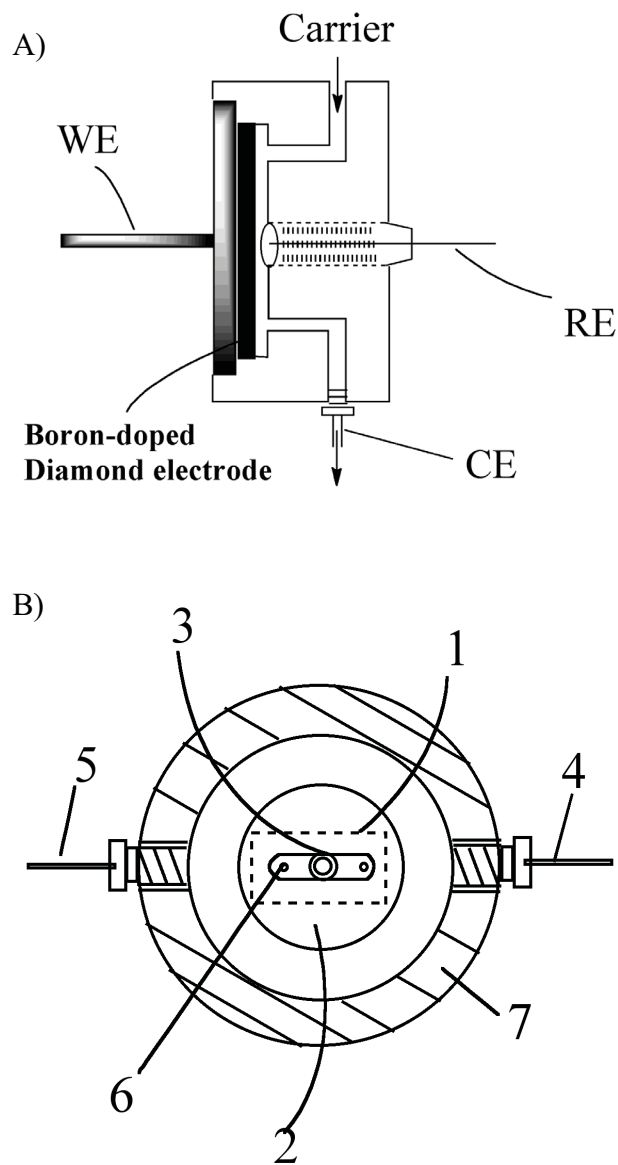


Fig. 2. BDD 電極を用いたフロースルーセルタイプ検出器

A) 側面図 CE = counter electrode, RE = reference electrode, and WE = working (BDD) electrode.

B) 断面図, where 1 = working electrode (dashed line), 2 = spacer, 3 = reference electrode, 4 = counter electrode, 5 = tube, 6 = effluent or eluent outlet, 7 = plastic jacket

フロースルーセルタイプとした理由として、フローインジェクションアナリシス (Flow injection analysis: : FIA) 及び高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography : HPLC) の検出器として適用することが可能であるからである。筆者は過去の研究で、フロースルーセルタイプの BDD 電極を FIA の検出器とし、糖関連化合物において検出条件の最適化を行った。その結果、1.6V 付近では糖関連化合物の検出はできなかったが、2.0V vs Ag/AgCl 付近の高電位を印加することで電解酸化が可能であり、糖関連化合物の検出感度は、単糖類で 100pmol、糖アルコール類で 10pmol、多糖類で 10pmol 付近であった (Table 1)²⁰⁾。

Tabel 1 BDD 電極を用いた FIA における糖関連化合物の検出限界

Compound	Detection limit (pmol, s/n=3)	R.S.D.% (20nmol, n=10)
Glucose	105.1	0.65
Galactose	101.2	1.25
Xylose	96.1	0.69
Fucose	52.9	2.41
Fructose	25.8	1.60
Sorbitol	10.2	2.00
Xylitol	11.7	2.60
Glycerol	12.7	1.68
Ethylene glycol	10.8	1.29
Maltose	11.2	1.45
Sucrose	10.0	1.23
Lactose	10.7	1.45
Raffinose	9.9	0.95
Maltohexaose (G6)	10.0	1.50
Maltoheptaose (G7)	7.5	1.70
Cyclomaltohexaose (α -CD)	9.8	0.90
Cyclomaltoheptaose (β -CD)	5.0	0.93

BDD 電極を用いた糖関連化合物の検出の特徴として、グルコースなどの還元糖のみならず、フルクトースなどのケトース、ソルビトールなどの糖アルコールも検出可能であった。しかしながら、これらの糖関連化合物の検出過程及び電解酸化反応過程についての解明はされていない。BDD 電極を糖関連化合物の分析法として確立し、BDD 電極の適用範囲を拡大するためには、電極表面上での反応を明らかにすることは不可欠であると考え、本研究では、BDD 電極表面上での電解酸化反応過程及び検出過程の解明を行った。

第一章では、BDD 電極表面上での電解酸化反応過程及び検出過程の解明を述べ、第二章では、BDD 電極の糖関連化合物の分析法への応用を述べた。

本論

第一章 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

1. ホウ素ドープダイヤモンド (BDD) 電極を用いたサイクリックボルタムメトリー

サイクリックボルタムメトリー (Cyclic voltammetry) とは、電極に印可される電位を直線的に走査し、応答電流を測定する手法である。サイクリックボルタムメトリーの測定より、印加した電位を横軸、応答電流値を縦軸としてグラフを描くことで、サイクリックボルタムグラム (Cyclic voltammograms) が得られる。電極表面において分析対象物の酸化還元反応が進行した場合、化合物特有の酸化還元電位が確認できる。また、このサイクリックボルタムグラムの形状から、酸化還元反応が可逆的もしくは非可逆的のどちらかで電解反応が進行するかを判別することも可能である。そのため、サイクリックボルタムメトリーは、電極表面での電解反応を考察するうえでは重要なものである。例として、藤嶋らにおける、BDD 電極を用いた $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ の酸化還元反応のサイクリックボルタムグラムを示した (Fig. 3) ²¹⁾。

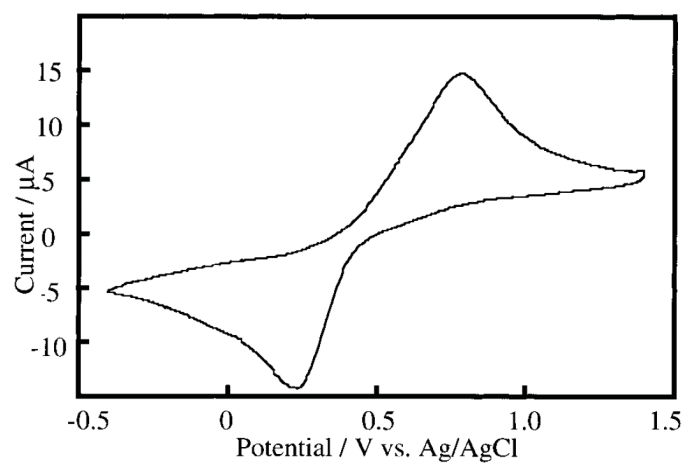


Fig.3 藤嶋らによる BDD を用いた $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ のサイクリックボルタムメトリー ²¹⁾ (一部改変)

このサイクリックボルタムグラムから、BDD 電極を用いた際の、 $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ の酸化電位は、約 0.7 V vs Ag/AgCl であり、 $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ の還元電位は、約 0.25 V vs Ag/AgCl であった。サイクリックボルタムグラムの形状は、測定条件である走査速度、走査回数、試料溶液の pH などを検討することで変化し、電極上での電解反応を解析することも可能である。

またサイクリックボルタムメトリーは、金属イオンの酸化還元反応のみならず、有機化合物の電解酸化反応にも応用することが可能である。Cerisola らは、BDD 電極を用いて、フェノールの酸化還元反応を検討している²²⁾。BDD 電極でのフェノールの酸化電位は、約 1.7V vs SHE であり、還元電位は得られていない (Fig. 4)。この場合、フェノールの電極表面での酸化は不可逆的なものであり、フェノールからは酸化物が得られ、酸化物は電極表面では還元されないということになる。

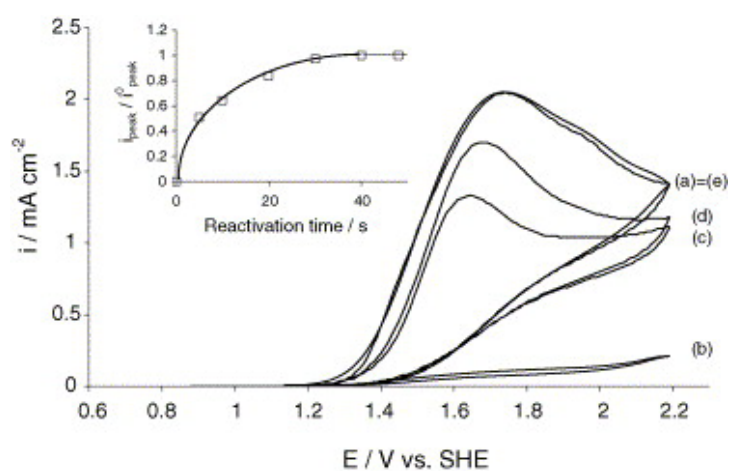


Fig. 4 Cerisola らによる BDD を用いたフェノールのサイクリックボルタムメトリー²²⁾

このように、サイクリックボルタムメトリーを用いることで、電極表面における、化合物特有の酸化電位及び還元電位を得ることができる。今回、難電解性である糖関連化合物においても、高電位であれば BDD 電極での酸化電位が確認できると考え、実験を行った。

1.1. 実験

1.1.1. 試薬

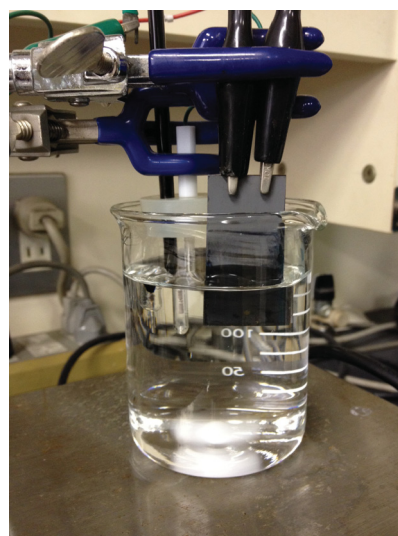
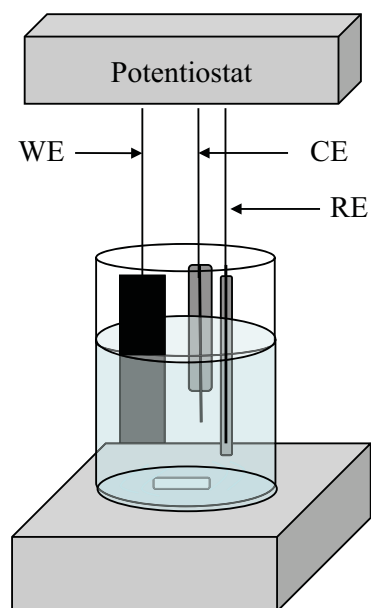
D-グルコースは Sigma-Aldrich 製を用いた。その他の試薬は、和光純薬工業社製の特級の試薬を用い、その他の試薬も和光純薬製の特級を用い、水は蒸留水を用いた。

1.1.2. ホウ素ドーパダイヤモンド (BDD) 電極

ホウ素ドーパダイヤモンド (BDD) 電極は、本田らによって作成され、提供されたものを使用した²³⁾。ダイヤモンドは、マイクロプラズマ CVD 法 (CVD : chemical vapor deposition) により、シリコンウェハの基板上に 17 μm の厚さに蒸着された。マイクロプラズマ CVD 法とは、プラズマを誘発する型式の化学気相成長 (CVD) の一種であり、さまざまな物質の薄膜を形成する蒸着法のひとつである。化学反応を活性化させるため、高周波を印加することで原料ガスをプラズマ化させるのが特徴である。炭素源には、アセトンとメタノールの混合液 (9 : 1)、ホウ素源には 酸化ホウ素を使用した。原子比率は、炭素 : ホウ素 (10000 ppm B/C) に調整を行った。電極形状としては、10×20 mm 角又は 20×50mm 角度のものを使用した。

1.1.3. サイクリックボルタムメトリー装置

サイクリックボルタムメトリーの測定に使用した電解酸化反応装置の模式図を Fig.5 に示す。ポテンシostatは、HABF501potentiostats/Galvanostats (HOKUTODENKO)を使用し、WX4420XY recorderでサイクリックボルタムグラムを記録した。各電極はポテンシostatに接続し、作用電極は BDD 電極、対極は白金電極、参照電極は銀塩化銀電極とした。電解槽は、ガラス製ビーカーを用いて、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 4.5) 中に 1~10 mM グルコースを溶解させたものを試料溶液とした。サイクリックボルタムメトリー測定の際には、電極表面の前処理として、作用電極である BDD 電極を、0.5 v/v % 塩酸溶液中で 2.60 V vs Ag/AgCl の酸化電位を 5 分間印可させ、電極表面の洗浄を行った後、測定を行った。



WE : Working electrode, CE : Counter electrode,

RE : Reference electrode

Fig. 5 電解酸化反応装置 サイクリックボルタムメトリー

1.2 結果及び考察

1.2.1. サイクリックボルタムメトリーによる酸化電位の確認

試料溶液は、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 4.5) 中に、0 ~ 10 mM の D-グルコースを溶解したものをを用いた。サイクリックボルタムメトリーの、走査範囲は 1.50 ~ 2.05 V vs Ag/AgCl、電位走査速度は、0.1 V vs Ag / AgCl / sec とした。得られたサイクリックボルタムグラムを Fig. 6 に示す。

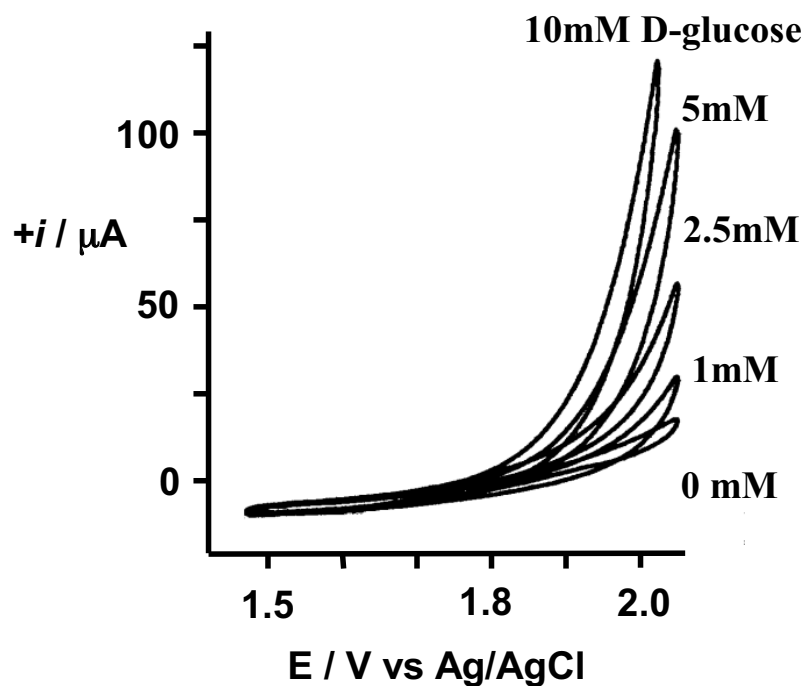


Fig. 6 BDD 電極でのグルコースのサイクリックボルタムグラム

BDD 電極を用いたサイクリックボルタムグラムの形状から、D-グルコースの酸化還元電位を確認することはできなかった。また、サイクリックボルタムグラムの形状は、可逆的又は不可逆的ないずれの形状でもなかった。しかし、ブランクから得られたサイクリックボルタムグラムと D-グルコースを添加した試料溶液のサイクリックボルタムグラムを比較した際、2.0 V vs Ag/AgCl 付近において、酸化電流値の上昇が確認された。そのため、試料溶液のグルコース濃度と酸化電流値の関係をプロットした。その結果、1.80 V vs Ag/AgCl 以上で、濃度依存的に酸化電流値 (+i/μA) が上昇していた。1.93 V の時点においての、+i/μA は、0, 1, 2.5, 5, 10 mM グルコースにおいて、20, 27.5, 42.5, 72.5, 107.5 μA となり、相関係数 $R^2=0.988$ の直線関係が得られた (Fig. 7)。

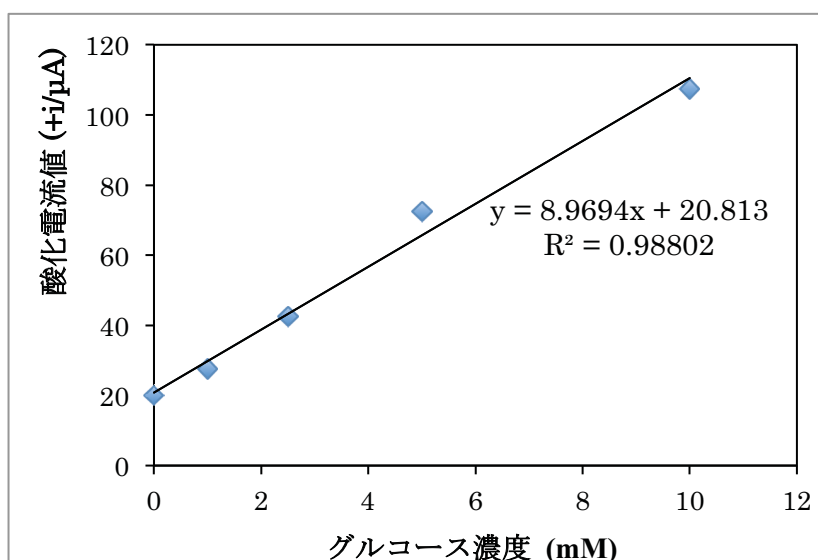


Fig.7 グルコース添加濃度と酸化電流値の直線性

BDD 電極とグルコースのサイクリックボルタムグラムの形状が不可逆的でも可逆的でもなく、酸化電位が得られなかったこと、及びグルコースの添加濃度に応じて酸化電流値が上昇したことから、印加電圧 2.0 V vs Ag/AgCl 付近での電流変化は BDD 電極と D-グルコースが直接反応したためではなく、電極表面に生成した物質を介して間接的に反応しているためと考えられた。

さらに、ブランク溶液のサイクリックボルタムグラムと、D-グルコースを添加した場合の、立ち上がりの酸化電位の変化を、5 mM D-グルコースを 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 1.8~10) 中に溶解させたものを試料溶液として検討した。試料溶液の緩衝液 pH を変化させた場合の、立ち上がりの酸化電位の変化を確認した。使用する緩衝液の pH が pH4.5 の時、立ち上がりの酸化電位は、1.7 V vs Ag/AgCl であったのに対し、pH6.7 では、1.6 V vs Ag/AgCl であり、緩衝液の pH が高いと立ち上がりの酸化電位が低下した (Fig. 8)。

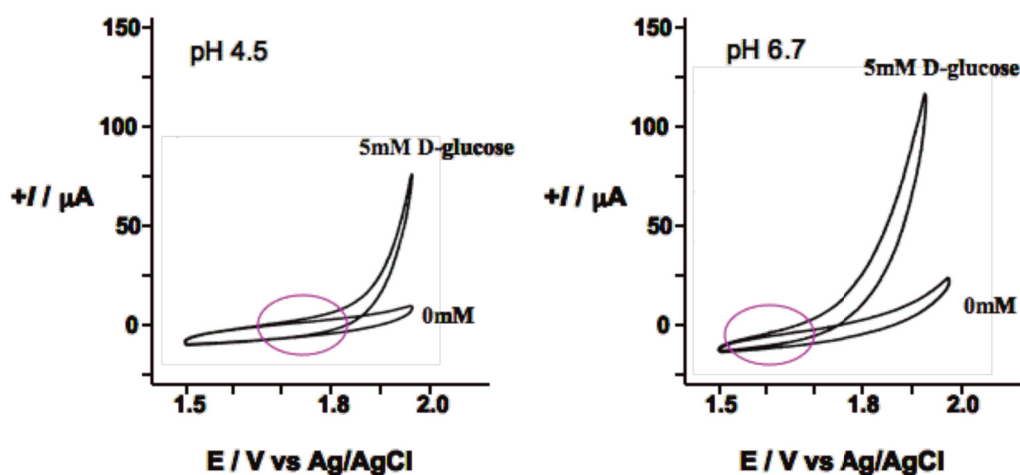


Fig. 8 緩衝液 pH を変化させたグルコースのサイクリックボルタムグラム

横軸に pH、縦軸に立ち上がりの酸化電位 (E_p/V vs Ag/AgCl) でプロットを行った結果を、Fig. 9 に示す。

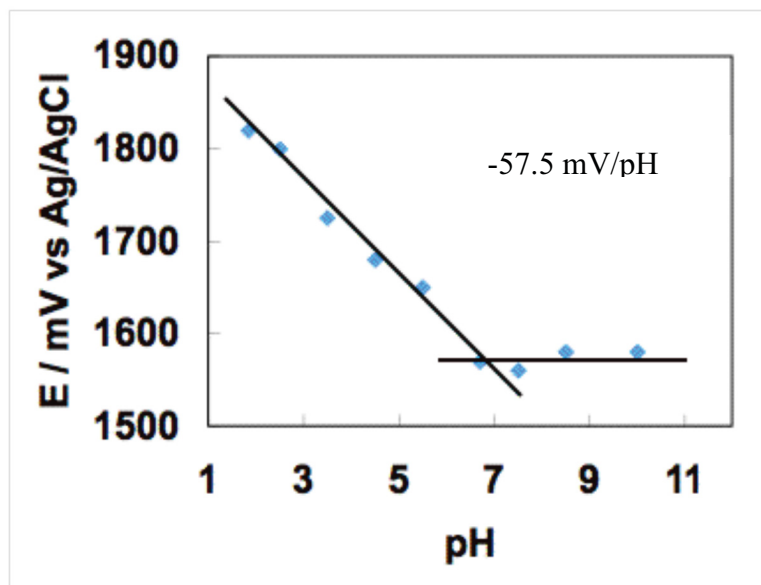
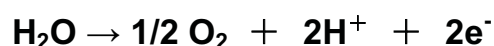


Fig. 9 BDD 電極における酸化電位-pH プロット

酸化電位-pH プロットより、pH 1.8 から pH 7.0 に向かって、直線的に酸化電位 (E_p)の低下が起こり、塩基性側ではほぼ一定であった。pH 1.8~pH 6.7 での直線関係の傾きは、 -57.5 mV/pH となった。

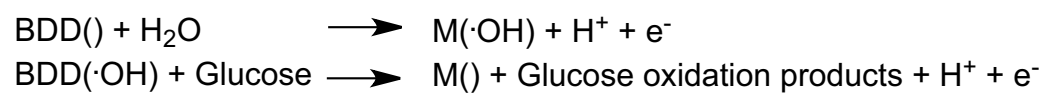
水の電気分解では、ネルンストの式により、 -59 mV / pH になることが知られている^{19,24)}。



$$E \text{ (V)} = - 0.059 \text{ V / pH}$$

今回の BDD 電極を用いた D-グルコース溶液の電解反応の酸化電流の pH 依存性の測定 (Fig. 9) から、BDD 電極を用いたグルコースの電解反応では水の電気分解が律速となっていると考えられた。さらに、BDD 電極表面では、 1.0 V vs Ag/AgCl 付近の酸化電位において、ヒドロキシルラジカルが生成することも報告されている^{16,17)}。そのため、今回の実験においても水の電気分解から生じるヒドロキシルラジカルの関与が示唆された。すなわち、BDD 電極表面で水の電気分解が起こり、糖は水の電気分解により生じたヒドロキシルラジカルと反応

すると考えられた。以下に考えられる反応を示す。



2. ヒドロキシルラジカルの定性反応

前節までの検討より、BDD 電極表面上には水の電気分解から生じるヒドロキシルラジカルが生成することが示唆され、生成したヒドロキシルラジカルと D-グルコースが反応していることと考えられた。そこで、BDD 電極表面でのヒドロキシルラジカルの発生を次の定性反応を利用して確認した。

クマリンはヒドロキシルラジカルと反応すると、7-ヒドロキシクマリンとなることが知られており、この反応は固体電極表面でのヒドロキシルラジカルの定性的検出に利用されている²⁵⁾。クマリンから 7-ヒドロキシクマリンの反応過程を Fig. 10 に示す。7-ヒドロキシクマリンは、励起波長 375 nm、蛍光波長 453 nm で蛍光を示す。BDD 電極表面において、ヒドロキシルラジカルが生成するならば、クマリンは 7-ヒドロキシクマリンに酸化されて、蛍光を示すこととなる。

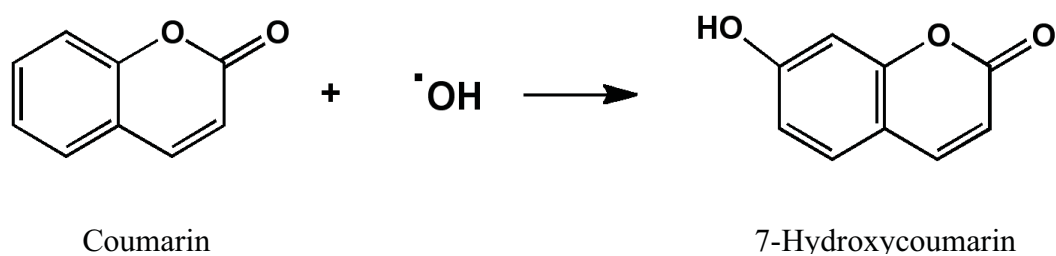


Fig. 10 クマリンとヒドロキシルラジカルの反応

2.1 実験

2.1.1. 試薬

クマリン 及び 7-ヒドロキシクマリンは関東化学製を用いた。その他の試薬は、和光純薬工業社製の特級の試薬を用い、水は蒸留水を用いた。

2.1.2. ヒドロキシルラジカルの検出反応装置

ヒドロキシルラジカルの定性反応は、前節のサイクリックボルタムメトリーの測定に使用した装置と同様の装置を使用した。標準溶液は、 $0.2\ \mu\text{M}$ 7-ヒドロキシクマリン、試料溶液は、 $10\ \mu\text{M}$ クマリンとした。標準溶液及び試料溶液は、どちらも $100\ \text{mM}$ のリン酸緩衝液 (pH 4.5) を溶媒とした。電解酸化は、酸化電位 $2.0\ \text{V vs Ag/AgCl}$ を一定時間、スターラーで攪拌しながら印加し、電解酸化時間は 30 分及び 60 分で行い、得られた反応溶液の蛍光スペクトルを測定した。分光蛍光光度計は、FP-8000 series (日本分光)を用いて行い、励起波長 $375\ \text{nm}$ を照射した際の発光スペクトルを測定した。

2.2. 結果及び考察

2.2. ヒドロキシルラジカルの定性反応

電解酸化条件は、実験の項に示した条件で行った。初めにブランク (pH 4.5 のリン酸カリウム緩衝液)、クマリン溶液及び標準溶液 (7-ヒドロキシクマリン溶液) のスペクトルを Fig. 11 に示した。ブランク及びクマリン溶液は、460nm 付近に蛍光は示さなかった。標準溶液の 7-ヒドロキシクマリンの蛍光スペクトルは、460nm 付近に蛍光の極大を示した。

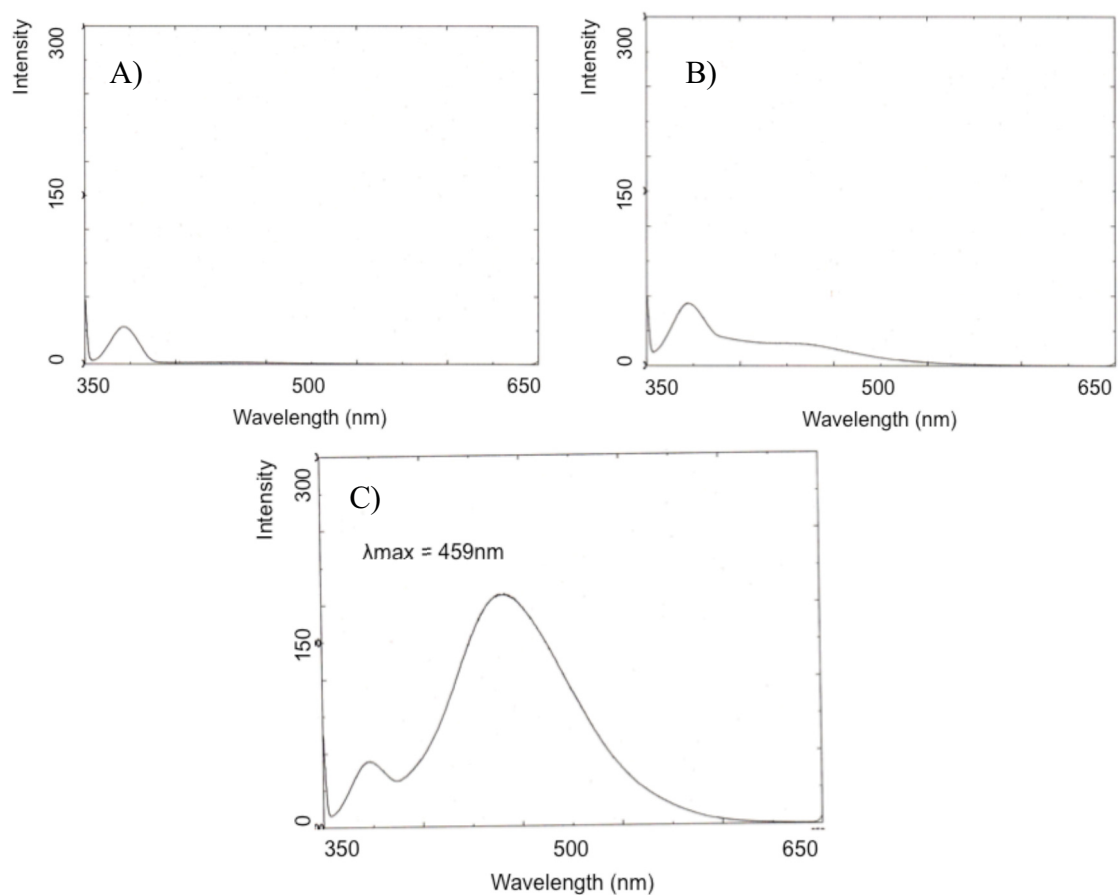


Fig. 11 ブランク、クマリン溶液及び標準溶液の蛍光スペクトル

- A) ブランク (pH 4.5 のリン酸カリウム緩衝液)
- B) クマリン溶液
- C) 標準溶液 (7-ヒドロキシクマリン溶液)

次に、クマリン溶液を BDD 電極を用いて、一定時間電解した後の溶液の蛍光スペクトルを測定した。その結果、電解酸化反応後の試料溶液は、460 nm 付近に蛍光の極大を示した。また、電解酸化時間 30 分よりも 60 分の方が蛍光強度が高かった。これらの結果より、BDD 電極に高電位の酸化電位を印加した際、水の電気分解が起こり、電極表面にヒドロキシルラジカルが生成することが確認された。糖関連化合物の電解酸化においても、BDD 電極により水が電気分解して生じたヒドロキシルラジカルが D-グルコースに反応していると推察される。

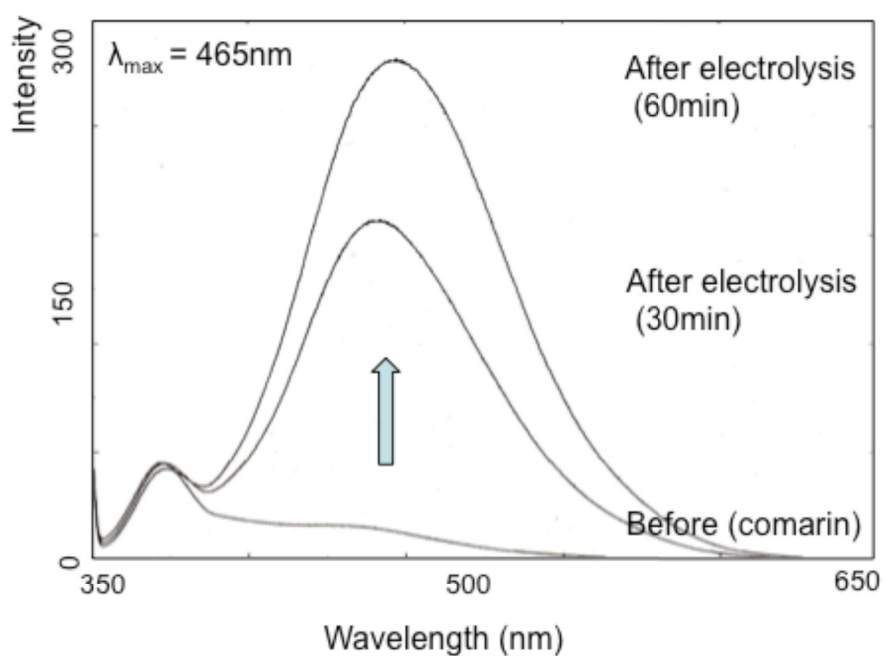


Fig. 12 BDD 電極を用いたクマリンの電解酸化前後の蛍光スペクトル

3. 糖関連化合物の電解酸化反応及び検出過程

サイクリックボルタムメトリーの測定より、D-グルコースは電極表面と直接反応しているのではなく、水の電気分解より生じるヒドロキシルラジカルと反応している可能性が考えられた。また、クマリンを用いたヒドロキシルラジカルの定性反応より、ヒドロキシルラジカルを確認することができた。BDD 電極表面での糖関連化合物の電解酸化反応をよりいっそう明らかなものとするため、電解酸化の主生成物の分離精製を行った。電解酸化反応のモデル化合物として、2 種類の化合物を用いた。1 つは、糖部位と芳香族部位の両方を合わせ持つ、Benzyl α -D-glucoopyranoside、2 つめは、代表的な糖関連化合物である D-グルコースを用いた。

Benzyl α -D-glucoopyranoside を採用した理由は、芳香族部位を持っているため、分離と検出が容易であり、ヒドロキシルラジカルの補足も可能であると考えたからである。また、D-グルコースを採用した理由は、D-グルコースの電解酸化生成物を確認することで、糖関連化合物の電解酸化過程が推察できると期待したためである。

3.1. 実験

3.1.1. 試薬

D-グルコース、tris (2,2-bipyridine) ruthenium (II) chloride hexahydrate は Sigma-Aldrich 製を用いた。Benzyl α -D-glucopyranoside、シュウ酸は和光純薬工業社製の試薬を用いた。有機溶媒は、関東化学社製の特級溶媒を用い、その他の試薬は和光純薬製の特級を用いた。水は蒸留水を用いた。

3.1.2. リサイクル FIA 流路装置

本実験では、HPLC 及び FIA での検出過程を解明することを目的としているため、フロー系での電解酸化装置を用いた。Benzyl α -D-glucopyranoside 及び D-グルコースの電解酸化反応を、リサイクル FIA 流路を用いて行った。リサイクル FIA 流路は、FIA の基本流路から得られた廃液をリサイクルさせるシステムである。Fig. 13 に構築した装置を示す。

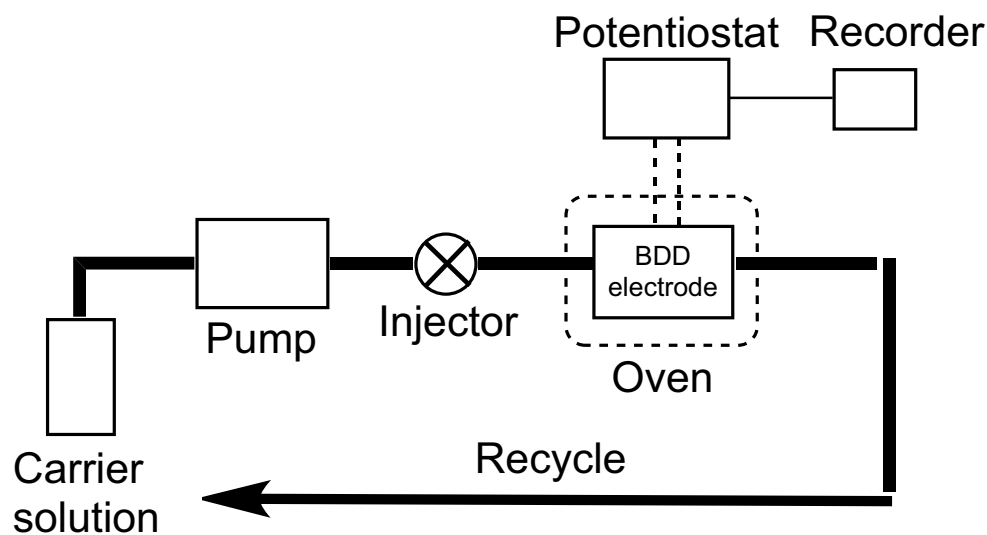


Fig.13 BDD 電極を用いたリサイクル FIA 流路

電解酸化反応に使用したキャリヤーは、5.4 mM の Benzyl α -D -glucopyranoside を 50 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 4.5) 中に溶解させた。D-グルコースの電解酸化反応に使用したキャリヤーは、5.6 mM のグルコースを 50 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 4.5) 中に溶解させた。これらのキャリヤー溶液を、HPLC 用ポンプ LC-10A (島津製作所)を用いて、1.0 mL / min で送液した。電解酸化反応は BDD 電極を使用し、温度は恒温槽 (COLUMN OVEN Model 505 ; FLOM)を用いて 30 °C に設定した。酸化電位は、ポテンショスタットによって、2.0 V vs Ag/AgCl に設定し電解酸化を 7 日間行った。これより得られた試料は減圧下で 20 倍に濃縮したのち HPLC を用いて分取精製した。HPLC には、LC-10AD システム (島津製作所)を使用し、カラム TSK-ODS 100V (4.6×150mm, TOSOH)、カラム温度は室温とした。検出には UV ($\lambda=254$ nm)を用いた。移動相は、A : 水, B : アセトニトリル, を A : B (100 : 0)を 15 分かけて (90 : 10)とし、その後 20 分で (30 : 70)とし、これを 5 分保持させ該当画分を分取した。精製した主生成物を減圧乾燥し、核磁気共鳴スペクトルおよび質量分析計によって、化学構造の確認を行った。¹H-NMR 及び ¹³C-NMR は JNM-LA 600 FT (600Mz) を用いて測定した。測定溶媒は、DMSO-*d*₆を用いて、内部標準物質に、テトラメチルシラン (TMS)を用いてこれを、0 ppm とした。質量分析計は、JEOL JMS-GCmate spectrometer を使用し、電子衝撃イオン化法 (イオン化電圧 : 70 eV)で測定を行った。

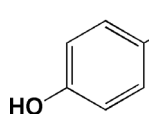
また、電解酸化反応の生成物として予想されるシュウ酸の分離定量も行った。シュウ酸の定量は、[Ru(bpy)₃²⁺]を用いた電解化学発光検出 FIA による定量法²⁶⁾を用いた。HPLC 条件は、溶離液に 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6)を Pump L9100 (HITACHI)を用いて 1 mL / min で送液し、ポストカラム検出試薬である 0.3 mM Ru(bpy)₃²⁺Cl₂ を含む 50 mM H₂SO₄ を INTERIJENT PUMP 310 (FROM)を用いて、0.4 mL/min で送液し、検出器直前で混和し検出器に導いた。検出器には、ECL-DETECTOR (COMET 2000A)を用い、カラムには Senshu Pak SAX (4.6×150mm, センシュー科学)を室温で用いて測定を行った。

3.2. 結果及び考察

3.2.1. リサイクル FIA 流路を用いた Benzyl α -D-glucopyranoside の電解酸化反応

リサイクル FIA 流路を用いて、Benzyl α -D-glucopyranoside の電解酸化反応を実験の項に示した条件で行った。その結果、7 日間の電解酸化反応において原料である Benzyl α -D-glucopyranoside (Retention time : 15 min) は完全に消失し、その時点において、生成物と思われるピーク(4,6,9,18 min)が確認された。それらのピークを分取し減圧下で溶媒を留去、乾燥させ、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及び EI-MS により構造の確認を行った。その結果、9 min のフラクションにおいて、白色結晶 2 mg が得られ、NMR および MS スペクトル*より、ヒドロキノン (Hydroquinone) が文献値²⁷⁾と比較し同定された。

*Spectrum data



Hydroquinone. White solid (2.0mg). δ_{H} (DMSO- d_6 ,400MHz) : 6.53 (4H, s, Ar-H), 8.56 (2H, s, Ar-OH); δ_{C} (DMSO- d_6 , 400MHz) : 115.5, 149.6; m/z (EI) 110 (M^+ , 93.3%).

また、それ以外のピークのフラクションについては、構造を確認するために必要な量を分離精製する事はできず、生成物を同定できなかった。しかし、BDD 電極を用いた芳香族化合物の電解酸化の報告^{28,29,30)}より電解酸化物としてヒドロキノンおよびカテコールが得られている。そのため、その他のピークは、UV で検出されることも考慮すると、2 置換フェノール類、キノン類等であると推定される。Brillas らは²⁹⁾、クロフィブリック酸を BDD 電極により電解酸化させた際の生成物として、芳香族類は、2 置換フェノール類を経由した後、有機酸類を経て、最終的には CO_2 になると提唱している。Fig. 14 に Brillas らによる、BDD 電極を用いたクロフィブリック酸の分解経路を示す。

今回の BDD 電極を用いた Benzyl α -D-glucopyranoside の電解酸化反応の結果から、電極表面でのヒドロキシルラジカルの反応性は非常に強く、糖部位と芳香族部位を結合している C-C 結合の開裂が起こっていると推察される。また、原料である、5.6 mM Benzyl α -D-glucopyranoside 150 mg から、得られたヒドロキノン は 2 mg と、収率は 1.33 % であり非常に少なかった。これは、ヒドロキノンがヒドロキシルラジカルと反応し、有機酸類のような分解物を生成するためと考えられた。

Brillas らによって提唱された分解経路²⁹⁾から推察した時、ヒドロキノン及び糖部位は、ヒドロキシルラジカルと反応し、有機酸等が生成する可能性があると考えられる。そのため、有機酸の一種であるシュウ酸を、高感度、高選択的に分離検出可能な、錯体化学発光検出 HPLC²⁶⁾で分析した。

錯体化学発光検出 HPLC における標準溶液は、シュウ酸を $0.25 \mu\text{M}$ で移動相に溶解させたものを用いた。試料溶液は、 5.4 mM Benzyl α -D-glucopyranoside ($150 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$)を、 2.0 V vs Ag/AgCl の酸化電位で7日間電解酸化反応させたものとした。標準溶液及び試料溶液は、実験の項に示した条件により分析した結果、標準溶液からは、保持時間 7.7 min にシュウ酸が溶出し、定量下限は、 50 pmol ($S/N = 10$)、ピーク面積は $50 \text{ pmol} \sim 2 \text{ nmol}$ の範囲で良好な直線関係が得られた。試料溶液においては、標準溶液のシュウ酸と同じ保持時間に溶出するピークが得られた。試料溶液に、標準溶液を添加したところ、同じ保持時間 7.7 min に溶出し、シュウ酸のピーク形状に変化を認めずピーク面積が増大した。このことから、試料溶液の保持時間 7.7 min のピークは、シュウ酸であると確認することができた。また、ブランクからは、保持時間 7.7 min 付近のシュウ酸のピークは見られなかった。試料溶液中に、シュウ酸の存在を確認できたため、絶対検量線法により試料の定量を行った。その結果、試料溶液 100 mL 中にシュウ酸は、 $1.25 \text{ mg} / 100\text{mL}$ 存在した。この方法において、 $150 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$ の Benzyl α -D-glucopyranoside を1週間電解酸化して、 1.25 mg のシュウ酸が生成したことになる。ヒドロキノンの時と同様、得られた生成物の収率は、 0.83% であり少量であった。本実験結果と Brillas らの報告²⁹⁾から、Benzyl α -D-glucopyranoside の芳香性部位は、ヒドロキノンなどの二置換フェノール類を経由しシュウ酸等の有機酸類を経て CO_2 に分解されると考えられる。また、糖部位も同様に有機酸類を経由して最終的に CO_2 に無機化されると仮定した。

3.2.2. リサイクル FIA 流路を用いた D-グルコースの電解酸化反応

リサイクル FIA 流路を用いて、Benzyl α -D-glucopyranoside の電解酸化反応の結果から、生成物として、ヒドロキノン及びシュウ酸を確認することができた。しかしながら、糖関連化合物の検出過程の解明をするにあたっては、糖関連化合物がヒドロキシラジカルと反応した後の生成物を確認する必要がある。そのため、Benzyl α -D-glucopyranoside の電解酸化と同様に、糖関連化合物においても、BDD 電極から生成するヒドロキシラジカルと D-グルコースが反応し、シュウ酸が生成することを確認するため、D-グルコースを用いて同様の実験を行った。

D-グルコースの電解酸化反応では、ヒドロキノンなどの芳香族化合物は生成物として得られないと考えられるため、シュウ酸のみ分析を行った。

その結果、100 mg の D-グルコースを 1 週間電解酸化して、0.315 mg のシュウ酸が得られた。D-グルコースを用いた電解酸化反応の結果からも、シュウ酸を分離定量することができた。Benzyl α -D-glucopyranoside の電解酸化反応と同様に、得られた生成物の収率は、0.32 %であり少量であった。そのため、糖関連化合物においても、ヒドロキシラジカルの電解酸化反応は連続的に進行し、最終的に CO₂ に無機化されると考えられる。

Varela は³¹⁾、過酸化水素と鉄を用いた Fenton 反応より生じたヒドロキシラジカルと D-グルコースを反応させた反応経路について考察している。この報告によると、ヒドロキシラジカルと D-グルコースを高温で反応させた場合、中間体としてグリセリン酸、シュウ酸、二酸化炭素が生成すると提唱されている。

本実験では、BDD 電極を用いた D-グルコースの電解酸化反応より、シュウ酸を確認することができたが、その他の有機酸類の検討を行うことはできなかった。BDD 電極での電解酸化反応を更に解明するためには、シュウ酸以外の酸化生成物も網羅的に解明する必要がある。これらの有機酸類の生成を確認することは今後の課題である。また、BDD 電極のみならず、Fenton 反応などを利用して、発生させヒドロキシラジカルを D-グルコースと直接反応させ、生成物を確認することも必要であると考えられる。

第一章 小活

BDD 電極における、Benzyl α -D-glucopyranoside 及びグルコースの電解酸化反応の主生成物及び主生成物の収率から推察した反応過程を Fig. 15 に示す。

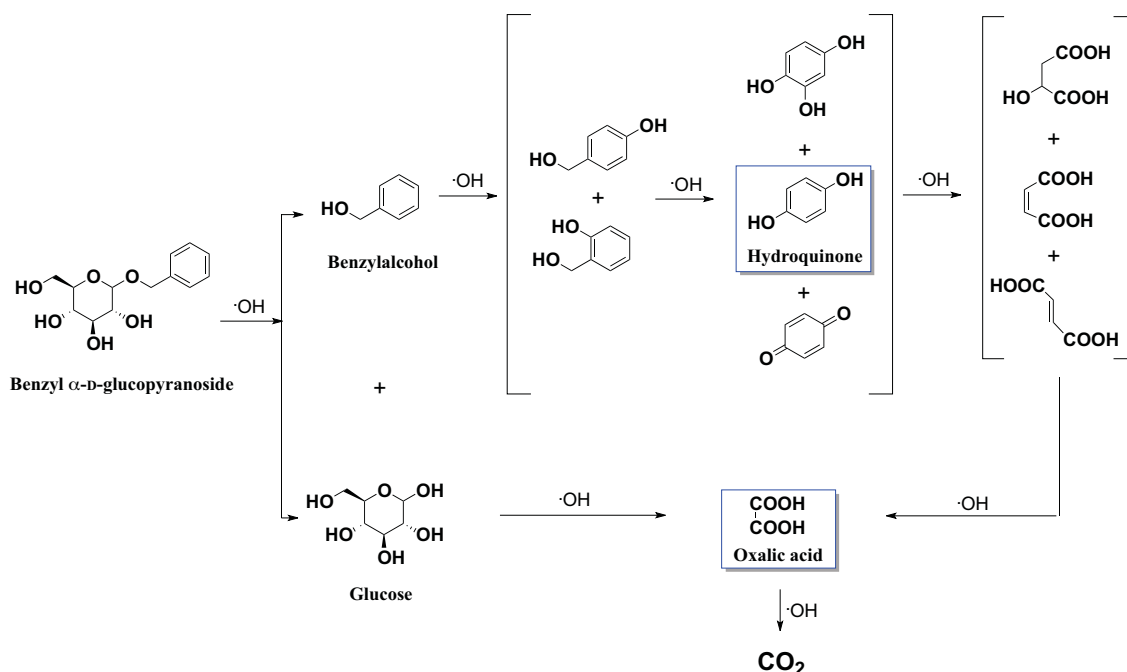


Fig. 15 BDD 電極における電解酸化反応経路（仮説）

糖関連化合物は、BDD 電極表面のヒドロキシルラジカルと連続的に反応し、C-C 結合の解裂が進行する。芳香族部位からは、2 置換フェノール類やキノン類を経由し有機酸類にまで分解され、糖部位も同様に有機酸類を経由した後、最終的には CO_2 にまで無機化されると考えられる。BDD 電極を用いた糖関連化合物の検出過程においても、本電解酸化反応が起こっていると考えられる。また、電解酸化反応過程はいずれにおいても酸化しており、酸化電流値が発生する。本分析装置における BDD 電極は、サイクリックボルタムメトリー、FIA 及び HPLC 検出器のいずれにおいても、ポテンショスタットに接続し酸化電流値をモニターしているため、糖関連化合物の検出が可能であったものと考えられる。

第二章 BDD 電極を用いた糖関連化合物の分析法への応用

1. α -amylase の酵素反応への応用

BDD 電極の糖関連化合物の分析法への応用を検討した。応用例として、マルトオリゴ糖 (G1~G7) を基質に用いた α -amylase の加水分解反応及び酵素阻害物質の分析法検討を行った。 α -amylase は、デンプンおよびグリコーゲンの、 α (1 \rightarrow 4)加水分解酵素として、生体に非常に重要であり、膵臓および唾液から主に分泌することが知られている。また、血清および尿の α -amylase 活性の測定は特に膵疾患の診断に有用である^{32,33}。

現在、これらの α -amylase 活性試験や、 α -amylase の加水分解パターンの解析には、2-クロロ-4-ニトロフェノール等で修飾されたマルトオリゴ糖が基質として用いられている^{32,33}。2-クロロ-4-ニトロフェノール修飾したマルトオリゴ糖及び天然型のマルトオリゴ糖の構造式を Fig. 16 に示す。

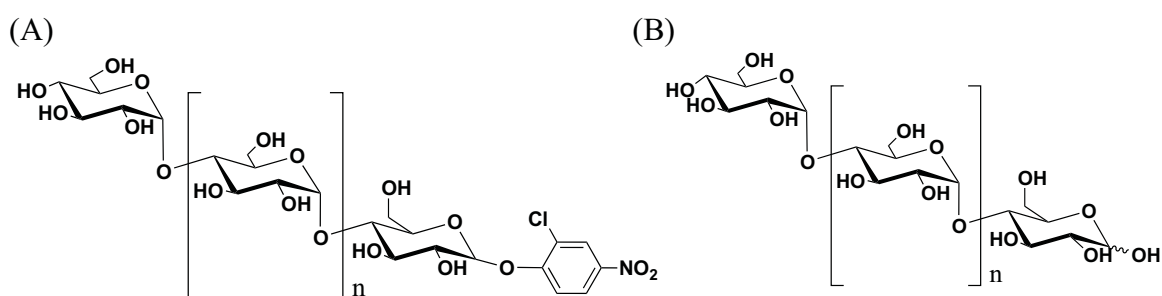


Fig. 16 2-クロロ-4-ニトロフェノールで修飾されたマルトオリゴ糖 (A) 及び天然型のマルトオリゴ糖 (B)

2-クロロ-4-ニトロフェノールを修飾したマルトオリゴ糖を用いた分析法は、遊離してくるニトロフェノールを吸光度により検出するものである。そのため、測定サンプルの濁りや着色の影響を受ける。

BDD電極を用いれば、天然型のマルトオリゴ糖 (G1~G7)の検出が可能であり、修飾物質による活性への影響および、基質の合成の必要としない簡便で迅速な分析法が行えると考えられる。そのため、マルトオリゴ糖を基質に用いた α -amylase の活性測定および反応パターンの探索を行った。

1.1. 実験

1.1.1. 試薬

D-グルコース、は Sigma-Aldrich 製を用いた。Maltose (G2) 、Maltotriose (G3) 、Maltotetraose (G4) 、Maltopentaose (G5) 、Maltohexaose (G6) 、Maltoheptaose (G7) は関東化学製を用いた。 α -amylase from human saliva Type IX-A、阻害物質としてアカルボース、ミグリトールは和光純薬工業社製の試薬を用いた。有機溶媒は、関東化学社製の特級溶媒を用い、その他の試薬は和光純薬製の特級を用いた。水は蒸留水を用いた。

1.1.2. α -amylase の酵素反応及び BDD 電極を用いた HPLC

α -amylase の酵素反応条件を以下に示す。 α -Amylase from human saliva 2.0 U / 20 μ L、マルトオリゴ糖 (G3 ~ G7) 50 nmol / 10 μ L、50 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 970 μ L を混合し室温で 10 分間インキュベートし、10 w/v%トリクロロ酢酸 10 μ L を加え、遠心分離 (12000 rpm, 5 min) し除タンパクを行った。その上澄液 10 μ L を HPLC に注入した。なお、阻害薬物の添加の際には、50 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) にそれぞれの濃度で溶解した阻害薬物 10 μ L を添加し酵素反応を行った。

酵素反応後の試料溶液の分析に使用した HPLC の模式図を Fig. 17 に示した。HPLC のカラムには、Develosil RPAQUOS-AR-5 (野村化学)、移動相に 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH4.5) を、ポンプに LC-10A (島津製作所) を用いて 1.0 mL / min で送液し、検出器に BDD 電極を使用した。検出器温度は恒温槽 (COLUMN OVEN Model 505 ; FLOM) を用いて 30 °C に設定し、試料はサンプルインジェクターを用いて注入した。酸化電位は、ポテンショスタットによって、1.90 V vs Ag/AgCl に設定し、その時生じる酸化電流を、CR-5A CHROMATOPAC (島津製作所) によって記録した。また、電極表面の洗浄には、HPLC 流路をそのまま用い、0.5 % 塩酸を 0.5 mL / min で送液し、2.70 V vs Ag/AgCl の酸化電位を 5 分間印加した。

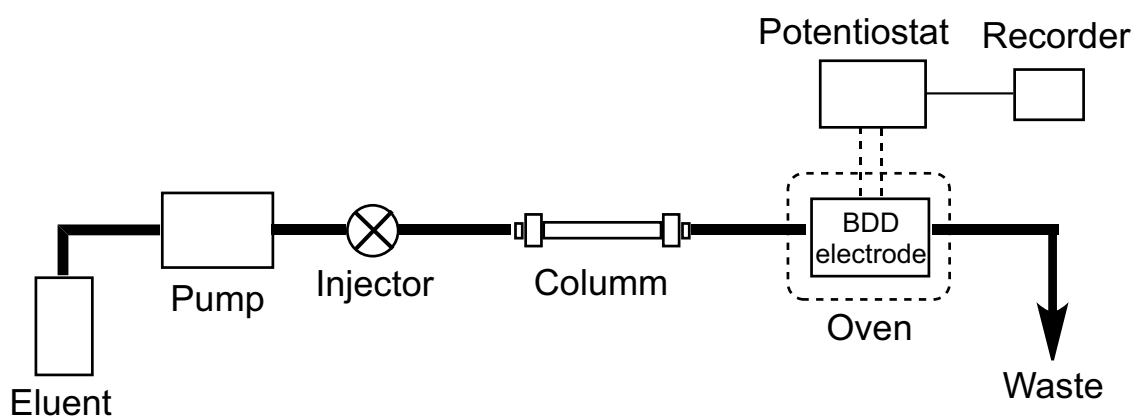


Fig.17 BDD 電極を用いた HPLC

1.2. 結果及び考察

1.2.1. マルトオリゴ糖の標準溶液のクロマトグラム及び検出感度

マルトオリゴ糖 (G1~G7)の標準溶液を用いて、実験の項に示した分析条件において測定したクロマトグラムを Fig. 18、検出限界を Table 2 に示す。

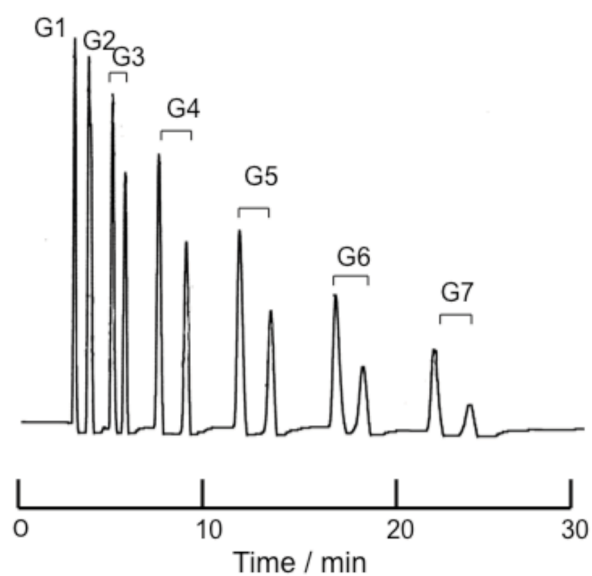


Fig. 18 BDD 電極を用いたマルトオリゴ糖のクロマトグラム

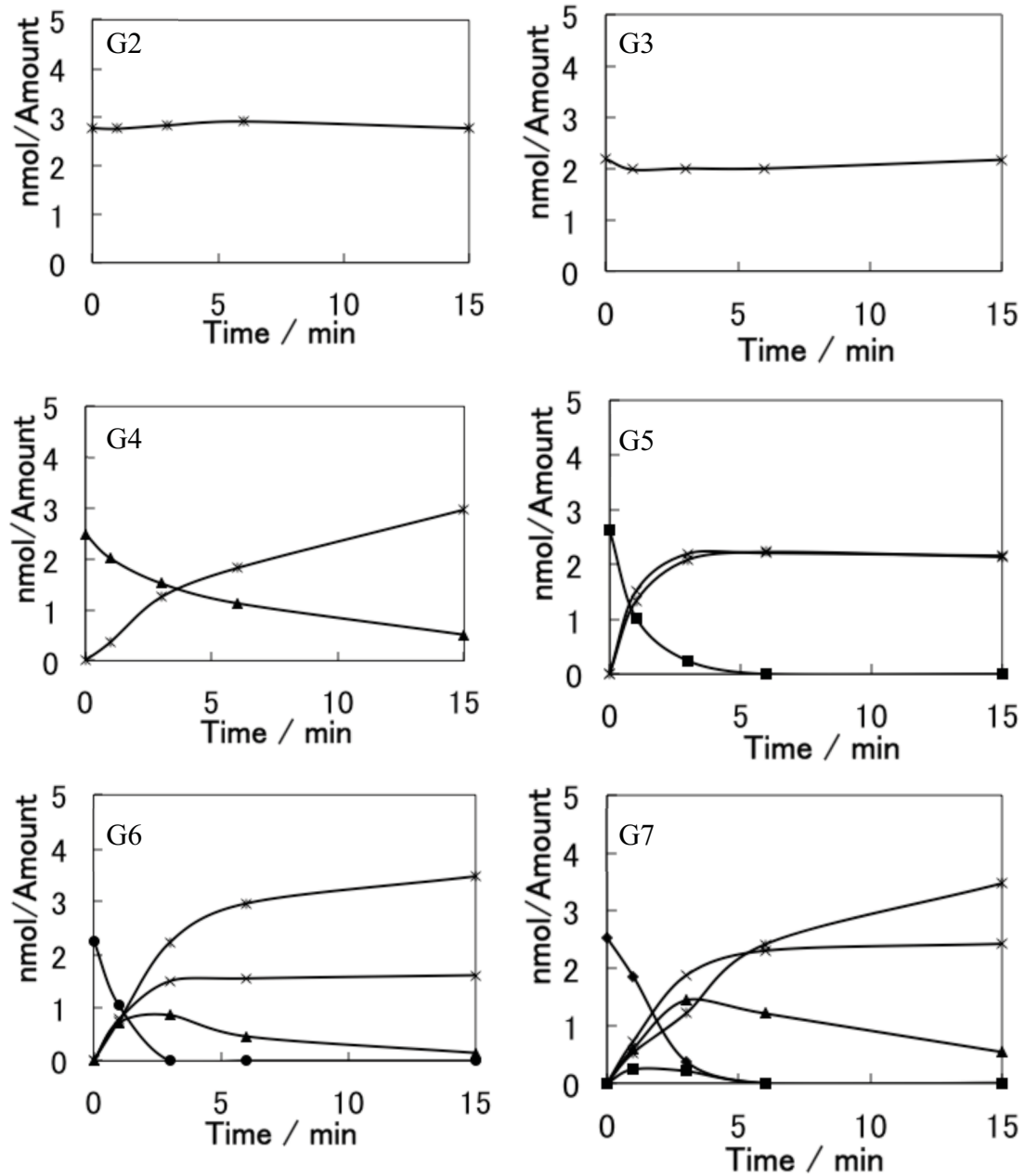
Table 2 BDD 電極を用いたマルトオリゴ糖の検出限界

Compounds	Detection limit (pmol, s/n=5)
Glucose (G1)	50
Maltose (G2)	50
Maltotriose (G3)	50
Maltotetraose (G4)	25
Maltopentaose (G5)	25
Maltohexaose (G6)	50
Maltoheptaose (G7)	50

マルトオリゴ糖の標準溶液のクロマトグラムは良好な分離を示し、G1→G2→G3→G4→G5→G6→G7 とグルコースの重合度の順番に溶出し、G3 以降では、 β 、 α アノマーの順で溶出した。定量は、二つのアノマーピークの合算で行った。標準溶液での、それぞれのマルトオリゴ糖の検出限界は、G1 : 50pmol (S/N=5)、G2 : 50pmol (S/N=5)、G3- β : 50pmol (S/N=5)、G4- β : 50pmol (S/N=5)、G5- β : 25pmol (S/N=3)、G6- β : 50pmol (S/N=3)、G7- β : 50pmol (S/N=3) であった。また、ピーク面積の直線関係は、50nmol まで得られ、再現性は、日内で 3.3% (R.S.D.)、日間で、7.0% (R.S.D.) であった。

1.2.2. α -アミラーゼによるマルトオリゴ糖の酵素反応

マルトオリゴ糖を基質に用いたものについての、 α -amylase の加水分解を行って得られた反応生成物の分離定量の結果を Fig. 19 に示す。



Symbol: ◆ = G7, ● = G6, ■ = G5, ▲ = G4, × = G3, * = G2.

Fig. 19 マルトオリゴ糖の加水分解反応プロフィール

G7からは、3分間の酵素反によって主として、G4、G3、G2が生成し、その他、G5の生成も確認できた。その後、G4がG2に、G5がG3とG2に分解が進行する様子をモニターすることができた。G7からは、G5 + G2及びG4 + G3の生成が予想され、今回の結果より、G5 + G2が、G4 + G3よりも生成量として少ないことが示され、G7を基質に用いた時は、G4 + G3の開裂が主反応であることが示された。なお、G3およびG2の低分子のものは、さらなる分解は観察されなかった。G6からは、3分間の酵素反応の時点で、G4とG2、およびG3の生成を確認することができた。G6を基質に用いた場合は、G4 + G2及び2分子のG3の生成が予想され、結果より、3分間の酵素反応の時点において、G4の生成量は1nmol、G3の生成量は1.5nmolであった。G6からは、2分子のG3が生成することを考慮すると、G4 + G2、とG3においては、G4 + G2の生成が優位であることが示された。次に、G5を基質に用いた際には、G3 + G2が等モルで生成し、さらなる加水分解反応は起こらないと予想される。結果は、どの時点においてもG3 + G2がほぼ等モルで生成していた。G5における、酵素反応前と酵素反応後のクロマトグラムをFig. 20に示した。本分析法では、基質の減少および加水分解生成物が同時に短時間でモニターできることが示された。

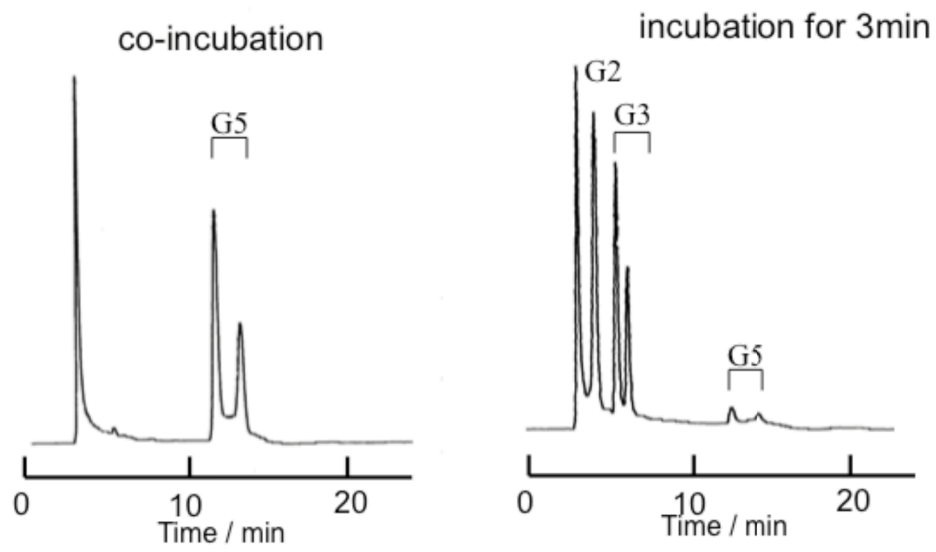


Fig. 20 マルトオリゴ糖を用いた酵素反応前後のクロマトグラム

次に、G5 を用いて酵素反応阻害薬物の添加による酵素反応への影響をモニターした。

1.2.3. α -アミラーゼの酵素阻害反応

酵素反応阻害薬物には、糖尿病治療薬として広く用いられている α -glucosidase 阻害薬である、アカルボース (Acarbose) とミグリトール (Miglitol) を用いた。アカルボースは、4糖構造をもつアミノオリゴ糖であり、 α -glucosidase と共に α -amylase を強力に阻害する^{34,35}。ミグリトールは、単糖構造の一部が窒素原子で置き換わった構造をとっており、 α -glucosidase のみを選択的に競合阻害する (Fig. 21)。この二つの既知酵素阻害物質の α -amylase に対する反応阻害様式の差を BDD 検出できるかを実践的に確認し、BDD 電極の有用性を検討した。

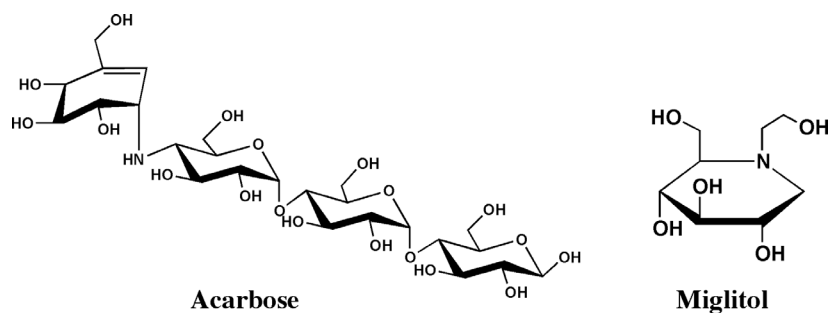


Fig. 21 アカルボース及びミグリトールの構造

アカルボースによる阻害は、**mixed non-competitive inhibition** であると報告されている^{34,35})。実験の項に示した酵素反応条件を適用した結果、既知の報告通り、アカルボースは α -amylase を顕著に阻害した。BDD 電極を用いた生成物の定量に基づいて、経時的变化を解析した結果、基質の G5 からの加水分解生成物である、G3 と G2 の生成は、0.25~25mM アカルボースと添加濃度の増加に応じて阻害が強くなることが確認された (Fig. 22)。今回の結果から得られた、Lineweaver-Burk のプロットは、 α -amylase の G5 の消失に関する K_m 値は 770.1 mM で、 V_{max} は 156.3 mM/min であった。

アカルボースを添加した際の酵素阻害は、競合的阻害や非競合的阻害等には当てはまらず、文献で示された **mixed non-competitive inhibition** と同様の挙動を確認する事ができた。

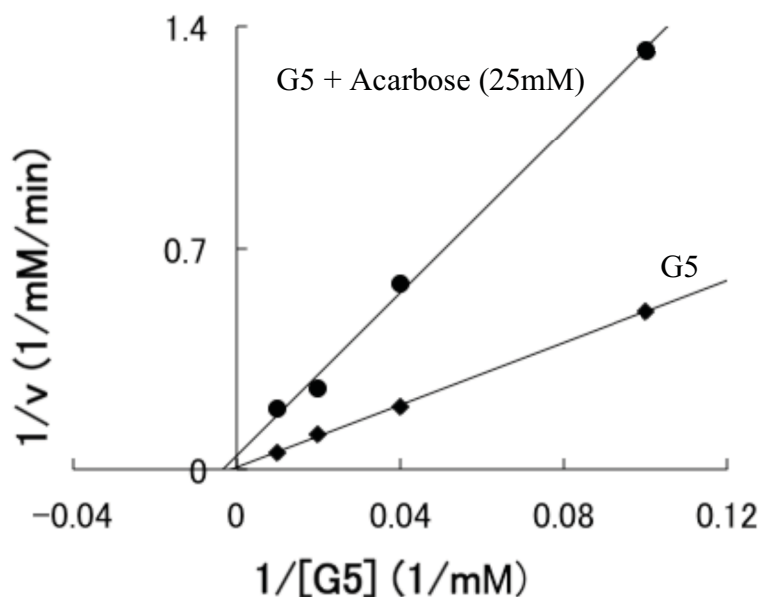


Fig. 22 アカルボースの α -amylase における Lineweaver-Burk プロット

次に、 α -amylase に対する阻害はないと報告³²⁾されているミグリトールにおいて、 α -amylase の酵素反応を行った結果を Fig. 23 に示す。基質 $50\ \mu\text{M}$ G5 に対して、 25mM ミグリトールを添加すると、基質の減少速度の低下は見られず、 α -amylase の加水分解反応の阻害は認められなかった。

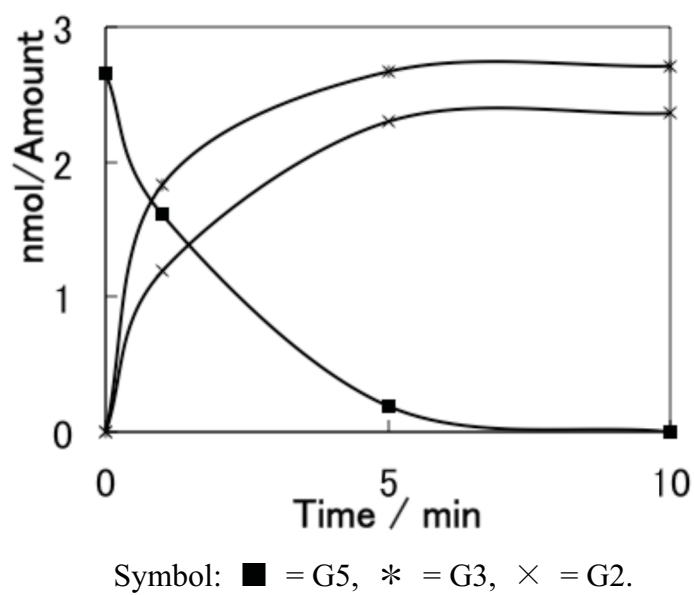


Fig. 23 ミグリトール添加時の酵素反応プロフィール

第二章 小活

BDD 電極を検出系に用いた HPLC により、 α -amylase の酵素反応阻害物質探索に有用であることがわかった。また、本分析系においては、基質の減少と生成物の増加を同時にモニターできた。今回、糖関連化合物の酵素反応には α -amylase を用いたが、 α -glucosidase など、その他の酵素反応にも十分に適用可能であると考えられる。さらに、天然型基質を用いて酵素反応を行うことができるため、修飾基の影響もなく、本来の酵素反応をモニターする事ができるため、その他の糖関連化合物の酵素反応にも幅広くて適用できると考えられる。

結語

糖関連化合物の検出法として期待される BDD 電極について、電極表面での電解酸化反応及び検出過程を解明した。D-グルコースを用いたサイクリックボルタムメトリーから、D-グルコースは電極表面と直接反応せず、水の電気分解により生じるヒドロキシルラジカルと反応していることが考えられた。また、ヒドロキシルラジカルの定性反応により、BDD 電極表面でのヒドロキシルラジカルの存在を証明することができた。

糖関連化合物の電解酸化反応の主生成物を検討したところ、Benzyl α -D-glucopyranoside をリサイクル FIA 流路で電解酸化した時の生成物は、ヒドロキノンとシュウ酸であった。これらの回収率は基質の量に比べて非常に少なかったことから、電極表面でのヒドロキシルラジカルの反応性は非常に強く、C-C 結合の開裂が連続的に進行し、最終的には CO₂ に無機化されると考えられる。さらに、グルコースを用いたリサイクル FIA 流路での電解酸化からも、シュウ酸を確認する事ができた。

高電位における BDD 電極表面上での反応はヒドロキシルラジカルを介したものであり、ヒドロキシルラジカルを利用することで、UV 吸収を持たない化合物の検出にも適用可能であると考えられる。

BDD 電極の応用として行ったマルトオリゴ糖を用いた α -amylase の加水分解反応では、糖関連化合物では難しいとされている天然型の基質を用いた分析法へ応用することができた。BDD 電極を HPLC の検出系に用いた本分析法は、糖関連化合物における適用範囲の拡大が期待される。

参考文献

- 1) S. Honda :, *Anal. Biochem.*, **140**, 1 (1984)
- 2) 村上 和雄, 小川 裕康, *分析化学*, **41**, 343 (1992)
- 3) Zadeii J. M., Marioli J., Kuwana T., *Anal. Chem.*, **63**(6), 649 (1991)
- 4) Prabhu S. V., Baldwin R. P., *Anal. Chem.*, **61**(20), 2258 (1989)
- 5) Reim E. R., Van Effen R. M., *Anal. Chem.*, **58**(14), 3203 (1986)
- 6) Luo P., Kuwana T., *Anal. Chem.*, **66**(17), 2775 (1994)
- 7) Johnson D. C., LaCourse W. R., *Anal. Chem.*, **62**(10), 589A (1990)
- 8) Lacourse, W. R., Johnson D. C., *Carbohydrate Res.*, **215**, 159 (1991)
- 9) Wei Y., Ding M. Y., *J. Chromatogr. A*, **904**, 113 (2000)
- 10) M. A. Lawson, G. R. Takeoka, G. F. Russell, *Liquid Chromatographic Analysis of Food and Beverages*, **2**, 379 (1979)
- 11) H. Mikami, Y. Ishida, *Bunseki Kagaku*, **32**, E207, (1983)
- 12) S. Hase, *Methods in enzymology* , **230**, 225 (1994)
- 13) M. Fujita, *ぶんせき*, **9**, 509 (2005)
- 14) J. Lee, S. M. Park, *Anal. Chim. Acta*, **545**, 27 (2005)
- 15) T. A. Ivandini, Y. Einaga, *Anal. Chem.*, **78**(10), 3467 (2006)
- 16) E. Popa, A. Fujishima, *Anal. Chem.*, **72**(7), 1724 (2000)
- 17) C. Terashima, A. Fujishima, *Anal. Chem.*, **74**(4), 895 (2002)
- 18) T. A. Ivandini, A. Fujishima, *Analyst*, **128**, 924 (2003)
- 19) T. A. Ivandini, Y. Einaga, *Talanta*, **71**, 648 (2006)
- 20) T. Hayashi, K. Uchikura, *Anal. Sci.*, **28**, 127 (2012)
- 21) H. Notsu, A. Fujishima, *J. Electroanal. Chem.*, **492** 31 (2000)
- 22) M. Panizza, G. Cerisola, *Electrochim. Acta*, **51**, 191 (2005)
- 23) K. Honda, A. Fujishima, *Electrochem. Acta*, **51**, 588, (2005)
- 24) 井上 徹, 相沢 益男, 藤嶋 昭 : *電気化学測定法 技報堂出版*, p.66, (1984)
- 25) M. Komatsu, A. Fujishima, *Chem. Lett.*, **32**, 396, (2003)
- 26) 内倉 和雄, *分析化学*, **39**, 323 (1990)
- 27) R. Bernini, D. Tofani, *Tetrahedron*, **61**, 1821 (2005)
- 28) R. T.S. Oliveira, L. A. Avaca, *Chemosphere*, **66**, 2152 (2007)
- 29) I. Sires, E. Brillas, *Electrochem. Acta*, **52**, 75 (2006)
- 30) H. Yining, L. Huijuan, *J. Envir. Sci.*, **21**, 1321 (2009)

- 31) O. Varela, *ADVANCES IN CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY*, **58**, 339 (2003)
- 32) S. Teshima, M. Ando, *Clin. Chim. Acta*, **150**, 165 (1985)
- 33) L. Kanadra, G. Gyemant, *Carbohydrate Res.*, **329**, 579 (2000)
- 34) M. J. Kim, K. H. Park, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **371**(2), 277 (1999)
- 35) S. Yoon, J. F. Robyt, *Carbohydrate Res.*, **338**, 1969 (2003)
- 36) T. Suganuma, T. Nagahama, *Carbohydrate Res.*, **303**, 219 (1997)
- 37) セイブル®錠 医薬品インタビューフォーム 第9版 株式会社三和化学研究所

謝辞

本研究実施の機会を与えていただき、その遂行にあたり多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学大学院研究科薬品分子化学研究室教授 本橋重康先生に謹んで深謝の意を表します。

また、本論文を作成するにあたり、有益なご助言並びにご指導を賜りました日本大学大学院薬学研究科生体機能化学研究室教授 飯島洋先生、日本大学大学院薬学研究科薬品分析学研究室教授 四宮一総先生に謹んで深謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学大学院研究科薬品分子化学研究室准教授 鳥山正晴先生に感謝いたします。特にこれまでの研究において多くのご助言を賜り、終始激励を頂きました日本大学大学院研究科薬品分子化学研究室助教 三浦基文先生に心より感謝致します。また、本研究の遂行にあたり多大なるご協力を頂きました日本大学大学院薬学研究科薬品分子化学研究室の中北敏賀氏並びに卒業研究生の皆様に深く感謝いたします。

長期にわたり本研究にご理解、激励をして頂きました日本ジェネリック株式会社 専務取締役 医薬研究所 所長 池田勝氏、日本ジェネリック株式会社 医薬研究所 分析研究部 部長 西村豊彦氏、日本ジェネリック株式会社 医薬研究所 分析研究部 課長 小田切靖裕氏並びに職場の皆様に感謝の意を表します。

最後に、これまで信頼し支えてくれ、終始我儘を許してくれた家族に心より感謝致します。