

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	アジン色素修飾電極によるNADH補酵素の電極触媒酸化
Title(English)	
著者(和文)	田中康一郎
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第3269号, 授与年月日:1996年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第3269号, Conferred date:1996/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士学位論文

アジン色素修飾電極による
NADH補酵素の電極触媒酸化

1996年3月

東京工業大学 大学院 総合理工学研究科

電子化学専攻

田中康一郎

目次

1	序論	1
1.1	研究の背景	1
1.1.1	アジン色素	1
1.1.2	NAD ⁺ /NADH 補酵素	3
1.1.3	NAD ⁺ 補酵素の再生	4
1.1.4	NAD ⁺ 補酵素の電気化学的再生	5
1.2	本研究の目的	6
2	フェノサフラニン色素誘導体の合成およびキャラクタリゼーション	14
2.1	緒言	14
2.2	実験	15
2.2.1	試薬	15
2.2.2	実験装置	16
2.2.3	パラアルキル置換フェノサフラニンの合成	16
2.2.4	キャラクタリゼーションの方法	18
2.3	結果および考察	18
2.3.1	パラアルキル置換フェノサフラニンの収量および収率	18
2.3.2	元素分析	18
2.3.3	H ¹ - NMR	19
2.3.4	式量レドックス電位および極大吸収波長の測定	19
2.4	結論	22
3	アジン色素薄膜修飾電極の電解作製およびそのキャラクタリゼーション	28
3.1	緒言	28
3.2	実験	28
3.2.1	試薬および実験装置	28

3.2.2	薄膜修飾電極の作製条件および評価条件	29
3.3	結果および考察	29
3.3.1	電解作製チオニン修飾電極	29
3.3.2	電解作製フェノサフラニン修飾電極	36
3.4	結論	41
4	アジン色素修飾電極によるNADHの触媒酸化	58
4.1	緒言	58
4.2	実験	58
4.2.1	試薬および実験装置	58
4.2.2	アジン色素修飾電極の作製法	59
4.2.3	測定系および測定方法	59
4.3	結果および考察	60
4.3.1	チオニン修飾電極	60
4.3.2	フェノサフラニン修飾電極	68
4.3.3	フェノサフラニン誘導体修飾電極	70
4.3.4	中間体形成モデルの妥当性	71
4.3.5	速度論的パラメーター ($k_{1([NADH]=0)}$, k_{+2} および K_M) の 解釈	71
4.4	結論	73
5	半経験的分子軌道法による考察	98
5.1	緒言	98
5.2	計算方法	100
5.2.1	計算プログラム	100
5.3	結果および考察	101
5.3.1	予備計算	101
5.3.2	キノン, 色素, NADH モデル化合物のHOMO, LUMO	102
5.3.3	電子移動メディエーターのLUMOのエネルギー準位と NADH酸化反応速度定数との関係	104
5.4	結論	111
6	アジン色素修飾電極のNADH電気化学検出器としての応用	122
6.1	緒言	122
6.2	実験	123
6.2.1	試薬および実験装置	123

目次	iii
6.2.2 修飾電極の作製	123
6.2.3 実験条件	124
6.3 結果および考察	124
6.3.1 チオニン修飾電極による NADH 触媒酸化	124
6.3.2 フェノサフラニン修飾電極による NADH 触媒酸化	126
6.4 結論	127
7 総括	134
8 参考文献	136
9 発表論文リスト	146
10 謝辞	147

第 1 章

序論

本研究で用いたアジン色素と NAD^+ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)/ NADH (NAD^+ の還元体) 補酵素について述べる。 NAD^+ 再生の必要性を指摘した後、修飾電極を用いた NADH 補酵素触媒酸化に関するこれまでの研究を概説する。

1.1 研究の背景

1.1.1 アジン色素

本研究では、アジン色素を電極に修飾し、その可逆な酸化還元機能を NADH の電極触媒酸化に利用している。本来この色素がどのような経緯で発見され、どのように利用されてきたのかを概観する。

アジン(azine)の定義は、Fig. 1.1に示すとおりであり、広義には「環内に窒素原子1個以上を含む6員環化合物の総称」[1]とされている。「窒素1個のほか異原子として酸素1個をもつものをオキサジン、異原子が硫黄1個のものをチアジンという。また窒素原子の数に応じてジアジン、トリアジン、テトラジンとよぶ。アジン環は、2つないし3つの二重結合をもち、それ自身あるいはオニウム塩として芳香族性を示すものが多い」[1]。「アジン染料」は、狭義には、「フェナジン環をもつ染料の総称」[2]と定義されている。アジン色素として、本研究では、チアジン骨格を持つ色素チオニン、フェナジン環を持つ色素フェノサフラニン(Fig. 1.2)およびその類縁体を取りあげる。

フェナジン色素であるフェノサフラニン誘導体の最初の合成体は、Mauvein と呼ばれる色素で、1856年 W. H. Perkin (1838-1907) によって偶然発見された[3], [4], [5]。彼がマラリアの特効薬キニーネの合成をめざしていたとき、合

成に失敗した溶液をアルコールで洗うと、きれいな赤紫の液体を得ることができたことが発端である。それを契機に、フェノサフラニン誘導体は多数合成され、染料として1859年に市販されるようにまでなった[6]。Colour Index (3rd. ed.) に過去の合成例が多数収録されている[7]。フェノサフラニンが単離されたのが1882年であったことからわかるように[8]、合成例には、混合物で同定が困難な色素も多かったようである。1972年にフェノサフラニン色素の合成法が確立された[9]。Mauveinは、日光に弱く堅ろう性に欠け、収率も低いいため、次第に製造されなくなった。一方、フェノサフラニン誘導体の多くは、Mauveinよりも高い堅ろう性を有する色素を得るために合成されたが、現在では、Colour Index に記載されていても市販で入手不可能な色素が多い。

フェノサフラニンの色素としての基本的な性質は、現在でも十分に解明されていない[10]。フェノサフラニン誘導体の最近の研究は、主に色素としての機能性に重点をおいている。例えば、色素の写真作用(分光増感作用と減感作用)の機構の電子論的研究などで、減感色素として登場している。谷らは、Hückel分子軌道法とポーラログラフ法に基づいてフェノサフラニン誘導体の写真作用の機構の解明を行なっている[11], [12]。一方、細菌学の分野で、サフラニンは、グラム染色の対比染色剤として用いられている[2]。市販の学習用顕微鏡セットの中には、この「サフラニン」溶液が添付されているものがある。これは、サフラニンがDNA(デオキシリボ核酸)の二重らせんの塩基部位と相互作用し、インターカレート(内部挿入)する性質を利用している[13]。Bünemannらは、フェノサフラニン誘導体をビニルモノマーの側鎖に結合させ、ポリマーを合成し[14]、DNAを認識するアフィニティークロマトグラフィーや、アフィニティー電気泳動の担持体[15]としての可能性を示した。前田らは同様に、この色素が側鎖にある合成ポリマーをDNAに疑似グラフト化する現象について報告している[16]。これらの色素がDNAにインターカレートを起こす現象の機構は、未だに明確ではない。9-アミノアクリジニウムやエチジウムプロミドのような色素分子に関しては、DNA塩基対間にインターカレーション(内部挿入)するモデルでは説明できない現象が報告されている[17]。

フェノチアジン色素であるチオニンは、NADHの蛍光消光剤としての用途[18]、および光ガルバニ電池のシステムの中で光吸収後 Fe^{2+} から電子を受けとるアクセプターとしての用途[19], [20]が報告されている。チオニンの励起状態における電極反応も詳細に検討されている[21]。電解作製したチオニン薄膜内の電荷移動がQCM(Quartz Crystal Microbalance, 水晶振動子マイクロバランス法)を用いて解明[22], [23]されてきている。チオニン薄膜修飾電極を用いたミオグロビン、ヘモグロビンに対する触媒還元能[24]も報告されている。サ

フラニンと同様、チオニンも細胞の核染色用色素 [2] としても用いられている。

1.1.2 NAD⁺/NADH補酵素

NAD⁺/NADHレドックス補酵素の性質 [25] について述べる。構造式を Fig. 1.3 に示す。この補酵素は、ニコチンアミド、リボース、アデノシンジフォスフォリボースから構成されており、生体内では約250種以上の脱水素酵素の補酵素として機能している。脱水素酵素およびNAD⁺補酵素による基質(SH₂, 例えばエタノール)の酸化反応の模式図を Fig. 1.4に示す。NAD⁺は、脱水素酵素に取り込まれているときに還元を受ける。還元型になった補酵素NADHは、その酵素から解離し、他の酵素へ移動してそこでも補酵素として働き、その第2のプロセスの間に、もとの酸化型NAD⁺に戻る。このようにNADHはキャリアーとして「還元等量」(reducing equivalent)すなわち「電子」を運ぶ。したがって、NAD⁺/NADHは「キャリアー補酵素」と呼ばれ、NAD⁺/NADHの酸化/還元ステップは生体内での電子移動の基礎となっている。酵素の活性中心に共有結合で結合し、しっかり取り込まれており、酵素反応の間に酵素内で連続的に再生されるような補酵素(例えばFMN(フラビンモノヌクレオチド), FAD(フラビンアデニンジヌクレオチド))が「補欠分子族」と呼ばれるのに対して、キャリアー補酵素は、酵素に共有結合することはない。

NAD⁺/NADHのキャリアー補酵素としての反応機構は、定常状態近似の手法を使った速度論的研究に基づいて、TheorellとChanceら[26]により明らかとなった。彼らは、エタノールや他の第一級アルコールの酸化反応に対して、次のメカニズムを提案した。

1. 「水素移動が酵素, 基質, 補酵素を含む三者複合体の中で起きること」
2. 「NAD⁺はつねにエタノールより先に酵素に結合すること」
3. 「逆反応では, NADHはつねにアセトアルデヒドよりも先に酵素に結合すること」

この機構が妥当であることは、他の研究者によって確かめられている [26]。

電子移動の観点からは、キノン化合物によるNADHモデル化合物の酸化反応機構が詳細に検討されてきている [27]。特に、酸化剤によるNADH酸化反応のメカニズムが(1電子, 1プロトン, 1電子)「3段階移動」という逐次の移動であるのか、ヒドリド(H⁻)の「直接移動」であるのか、を明らかにすることを目的として、多くの研究者 [28], [29], [30] がこの問題に取り組んできている。現在では、この反応機構を「3段階移動」か「直接移動」かという二者択一の問題としてみると誤った結論におちいる危険性が指摘されている。正味2電子,

1プロトンの反応ではあるが、どのようなプロセスが律速しているかは、いくつかの反応機構が考えられている[28], [29], [30]。分子軌道法による計算結果から、反応機構は反応分子と反応条件に依存することが理論的に予測[31],[32]され、物理化学的手法[33]により、その理論的予測が支持されている。

以上のように、生体内での酸化還元反応で欠かすことの出来ないキャリアー補酵素NAD⁺/NADHの化学の研究は、大きな一分野を形成している。

1.1.3 NAD⁺補酵素の再生

生体系ではNADHを必要とする酵素によりNAD⁺の再生機構が働いているけれども、脱水素酵素を生体外に取り出して*in vitro*におけるセンサー[34]や電解合成系[35],[36]への応用を行なう場合に、NAD⁺の再生が必要になってくる。NAD⁺/NADHの再生には、次のような方法がすでに知られている[37]。

1. 酵素を用いる手法,
2. 電気化学的手法,
3. 化学的手法,
4. 光化学的手法,
5. 生物学的手法の5つである。

それぞれの長所と短所についてまとめると次の通りである。

1. 酵素を用いる手法の長所は、(1)反応の選択性が高いこと、(2)反応のモニタリングが容易であること、(3)酵素触媒合成系となじむこと、などである。短所は、(1)コストが高いこと、酵素の安定性が悪いこと、(2)酵素固定化法を考える必要があること、(3)生成物を単離するのが複雑であること、(4)反応槽体積当たりの生産性が低いこと、などである。

2. 電気化学的手法の長所は、(1)必要試薬量が非化学量論的であること、(2)電力コストが低いこと、(3)電位の制御により反応の制御が容易であること、(4)反応のモニタリングが容易であること、(5)生成物単離が容易であること、などである。短所は、(1)生化学系との適合性が低いこと、(2)還元体(NADH)を再生する場合に反応の選択性が悪いこと、(3)電極が汚損されること、(4)装置が複雑であること、(5)色素、酵素などの電子移動媒体(メディエーター)が必要であること、などである。

3. 化学的手法の長所は、(1)試薬が安価であること、(2)酵素を加える必要が無いこと、(3)試薬のレドックス電位が高いこと、などである。短所は、(1)生化学反応との適合性が限られていること、(2)生成物単離が複雑であること、(3)収率が低いこと、(4)酸化体(NAD⁺)を再生する場合に、反応が遅いこと、

などである

4. 光化学的手法の長所は、(1) 必要試薬量が非化学量論的であること、(2) 酵素を加える必要が無いこと、などである。短所は、(1) 装置が複雑であること、(2) 生化学系との適合性が低いこと、(3) 安定性が限られていること、(4) 色素、光増感剤が必要であること、などである。

5. 生物学的手法の長所は、(1) 試薬(例えば、酸素やグルコース)が安価であること、(2) 反応選択性が高いこと、(3) 酵素が自己集積しているので酵素活性が高いこと、などである。短所は、(1) 手法がいまだに発展段階にあること、(2) 反応槽体積当たりの生産性が低いこと、(3) 生成物単離が複雑であること、(4) 酵素間の相対的活性のコントロールが難しいこと、などである。

以上のような長所、短所を概観すると、 NAD^+ または NADH の再生を必要とする酵素系では、生成物の単離の点を重視すると固定化メディエーター、固定化酵素を用いる電気化学的手法に数々の優れた特徴がある。

そこで、本研究では、 NAD^+ 再生の電気化学的手法に焦点を絞る。

1.1.4 NAD^+ 補酵素の電気化学的再生

生体内の重要な補酵素である NAD^+ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)とその還元体 NADH のレドックス(酸化還元)状態の制御は、 NAD^+ 依存型の250種類以上の脱水素酵素を用いるバイオセンサの開発[38]や高選択的有機電解合成[37]の観点より、たいへん興味を持たれている。

しかしながら、未修飾電極上での NADH の直接酸化に関するMoiroux, Elvingら[39][40][41]の系統的な研究により明らかとなったように、Fig. 1.5(A)によって生成された NADH を、Fig. 1.5(B)に従って電極で直接酸化するためには $\text{pH}7$ の緩衝溶液中において白金電極ではおよそ 1 V 、グラッシーカーボン(GC)電極ではおよそ 0.6 V で酸化される、すなわち高い過電圧(1 V 程度、 $\text{pH}7$ の緩衝溶液中での NAD^+/NADH レドックス対の式量レドックス電位は -0.560 V vs. SCE [37])が必要であることが知られている。よって、脱水素酵素を用いるバイオセンサの開発[38]や高選択的有機電解合成[37]の実用化において解決しなければならない基本的課題は、 NADH の直接電極酸化の高い過電圧を低くする電極触媒系を開発することである。

一方、Fig. 1.5(C)の電位スケールで示すように、高い過電圧がかかった条件すなわち NADH の直接酸化が起こる電位では、アスコルビン酸、ドーパミン、尿酸など、生体内で酸化されやすい物質もまた、容易に酸化される電位となっている[42]。 NADH のみを選択的に酸化し NADH を検出する上でこれ

らの物質の酸化は妨害となる。そこで、NADH酸化の過電圧を下げる目的で、電子移動を媒介(メディエーター)する、電子移動メディエーターの研究が行われてきている。

Fig. 1.6に、3つの代表的な電子移動メディエーターシステムを示す。(A)はメディエーターが系内に溶存している場合、(B)はメディエーターが電極に吸着固定されている場合、そして(C)はメディエーターが厚さのある薄膜の中に固定されている場合である。Fig. 1.6からわかるように、電子移動メディエーターは、NADHの間接電解である。電極との電子の直接的な授受を行ない、メディエーターの酸化体がNADHを酸化する。

Fig. 1.7に、これまで用いられてきている代表的な電子移動メディエーターの構造式を示す。これらの物質は、電気化学的に可逆で、その式量レドックス電位が、 NAD^+/NADH の式量レドックス電位とNADHの酸化電位との間に位置するという性質を兼ねそなえている[43]。金属錯体[44][45][46][47][48][49]、*o*-キノノン[50][51][52][53][54][55][56][57][58][59][60]、*p*-キノノン[61][62][63][64][65]、有機色素(フェノチアジン[66][67][68]、フェノキサジン[69][70][71][72])、フラビン[73] フェナジニウム塩[74][75][76][44][77][78]、などが主にメディエーターとして研究されてきている。

一歩進んで、NADH酸化の電子移動メディエーターの一般的な構造の共通点を指摘したのがGortonら[79]である。Fig. 1.8に、Gortonら[79]がまとめたNADHの電子移動メディエーターに必要な化学構造を示す。これらの構造は、他の多数の研究者による多数の研究から経験的に選び出された構造である。よって、理論的裏付けが待たれるところである。

1.2 本研究の目的

本研究では、NADH酸化の触媒として、アミノ基を有するレドックス色素に注目した。その理由は、アミノ基の電解酸化によりポリアニリン様の薄膜[80]が得られることが期待されるからである。薄膜にすることによりレドックス活性サイトが3次元的に集積し、NADH酸化触媒電流が増大すると期待される。このことをチオニンを用いて確かめた。

同様に、アミノ基を有するレドックス色素であるフェノサフラニン及びその誘導体に注目した。その理由は、NADHの酸化剤として有用性が認められているフェナジンメトサルフェート(Fig.1.7のphenazinesとして示した構造式、5-methyl-phenazinium methosulfate) [81],[34],[75]と同様にこれらの色素がアルキルフェナジニウム骨格を有するからである。同じレドックス活性サイトを

有する物質なのでNADHの酸化剤として同様に作用すると期待した。NADHを NAD^+ に酸化する酵素の活性中心には、補欠分子族であるFAD(窒素原子を多数含むイソアロキサジン骨格を持つ)が存在することが知られている[82]。フェノサフラニンがイソアロキサジンの構造に類似しているということもこの色素に注目した理由である。フェノサフラニンとDNAの塩基であるアデニンが相互作用する[13]こと、および1,4-ジヒドロピリジンがNADH自身のアデニン環とも相互作用する[83]ことから、フェノサフラニンがNADHとも同様に相互作用すると考えられることもこの色素を選んだ理由である。

フェノサフラニンによるNADHモデル化合物(シクロデキストリンに1,4-ジヒドロピリジンを固定化したもの)の酸化に関する報告[84]はあるが、フェノサフラニン色素によるNADHの電極酸化触媒能はこれまで報告されていない。そのNADH酸化触媒反応の定量的な解析を初めて行なった。

最後に、フロンティア軌道理論を用いて、電子移動メディエーターの化学構造と反応速度定数との関係について考察した。これは、目的に応じた電子移動メディエーターの選択指針、設計指針のための基本概念を明らかにするためである。

以下に各章の要旨を示す。

第2章では、フェノサフラニン誘導体の合成およびそのキャラクタリゼーションについて述べる。第3章では、アジン色素修飾電極の作製法およびその電気化学的および分光学的手法によるキャラクタリゼーションについて述べる。第4章では、アジン色素修飾電極によるNADH補酵素の触媒酸化反応の観察と、反応機構の解析について述べる。触媒酸化反応の観察では、アジン色素を多層修飾したFig. 1.6(C)の場合の触媒電極システムについての議論をする。触媒酸化反応機構の解析では、Fig. 1.6(B)のように色素を吸着固定させた単層修飾電極での議論が中心である。第5章では、電子移動メディエーターの化学構造とNADH酸化反応速度定数との関係について、フロンティア軌道理論に基づいて議論するとともに、NADH酸化のための電子移動メディエーターの設計指針について議論する。第6章では、アジン色素修飾電極のNADH検出器としての特性をフローインジェクション分析法に基づいて述べる。第7章では、本研究の成果を総括する。

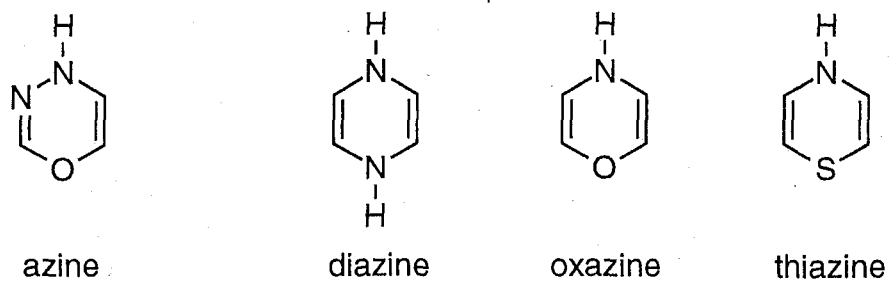


Fig 1.1: Structural formulas of azine compounds.

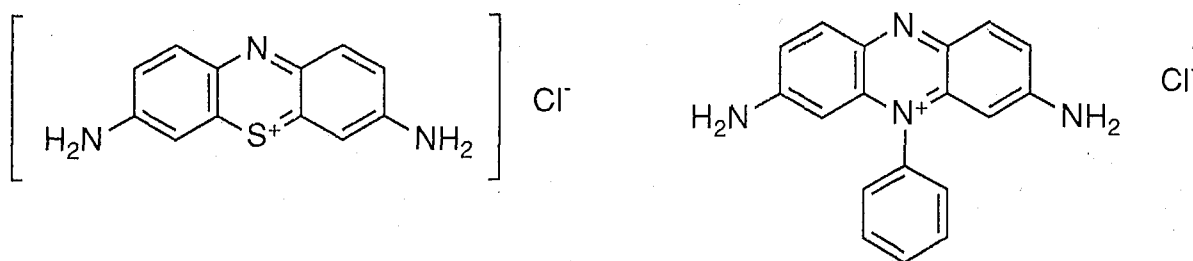


Fig 1.2: Structural formulas of thionine and phenosafranine.

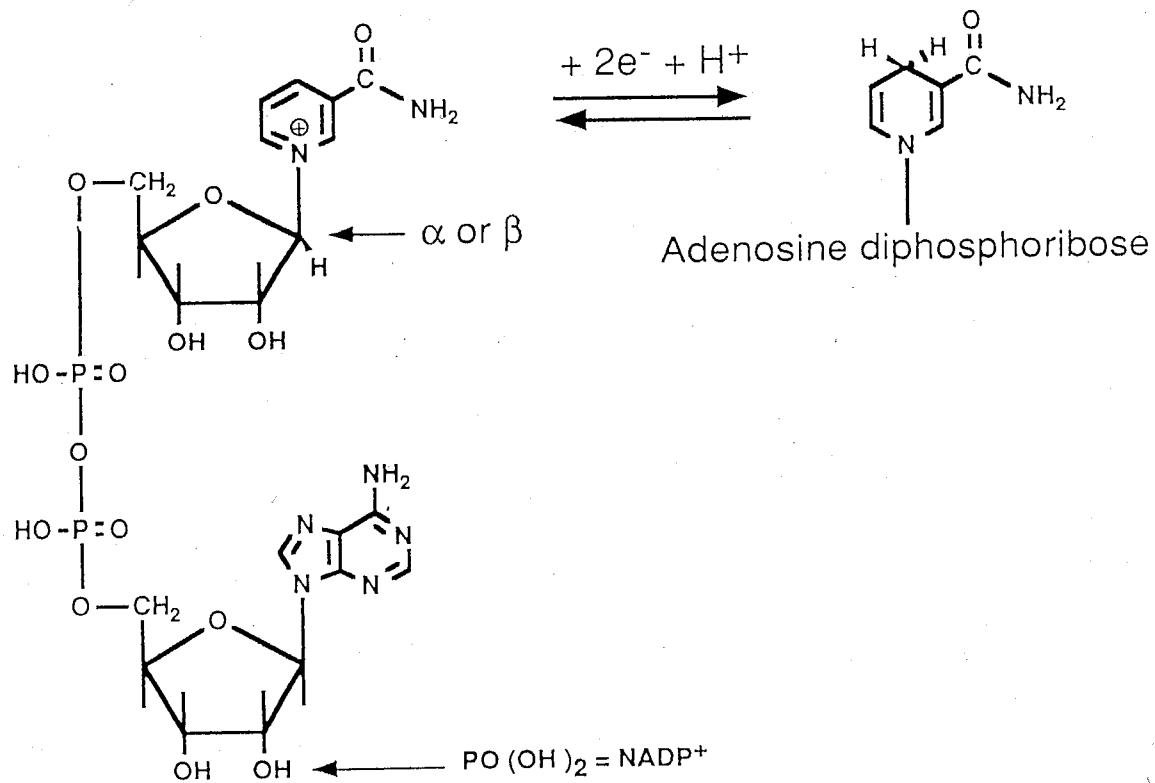


Fig. 1.3. Structural formulas(β -form shown) and overall redox reaction of nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+ , and its reduced form, the enzymatically active NADH .

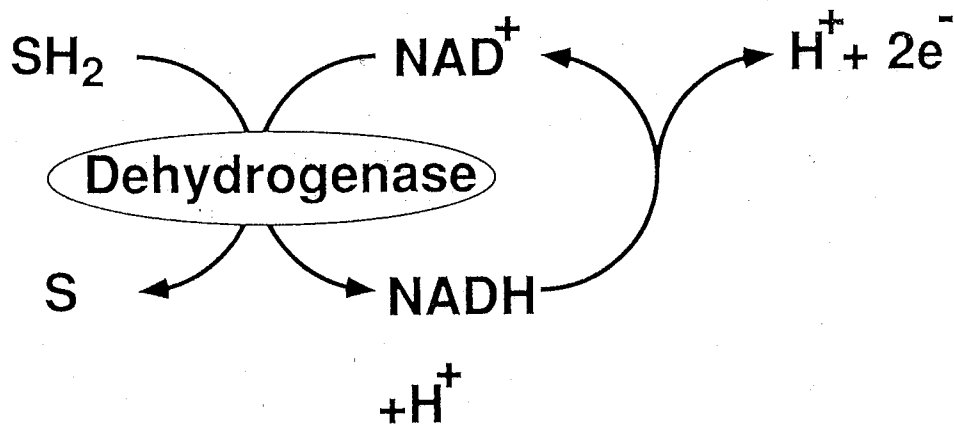


Fig 1.4: Schematic depiction of dehydrogenation reaction by dehydrogenase enzyme and NAD^+ coenzyme.

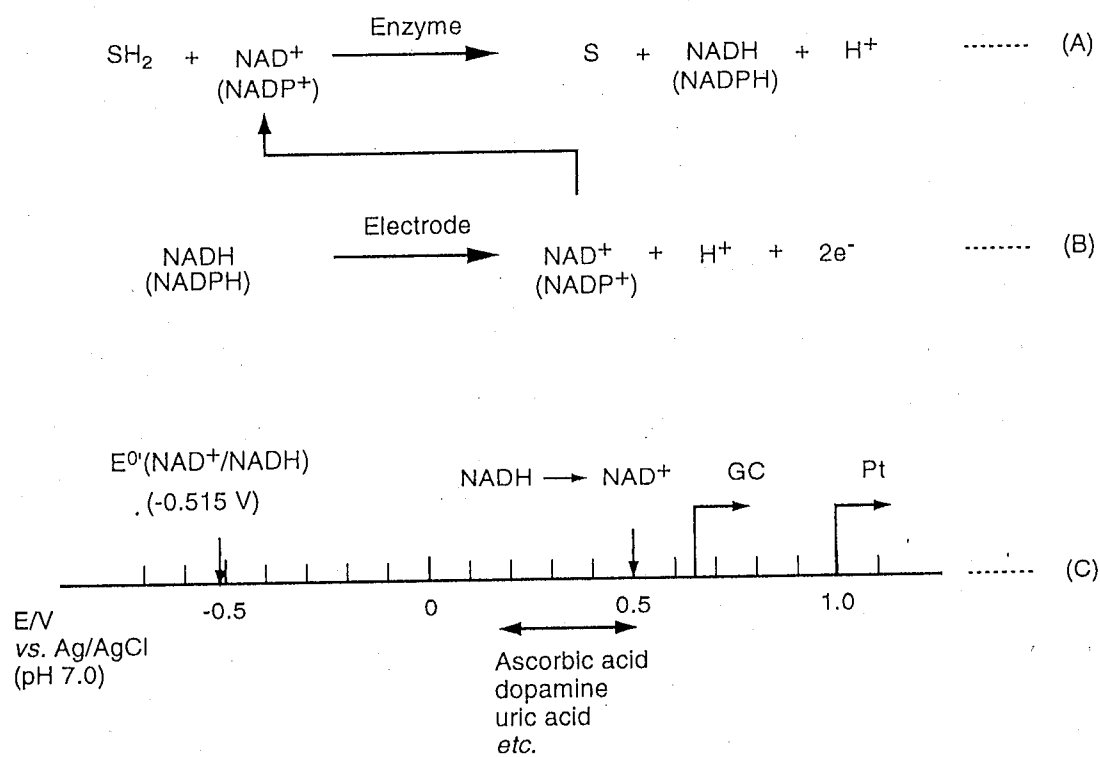
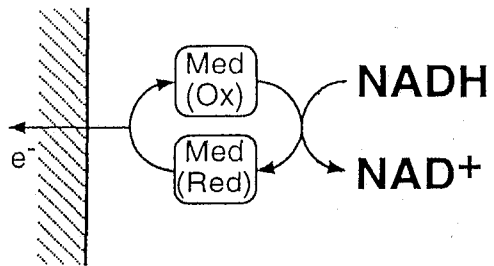
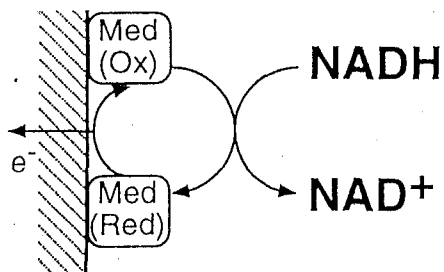


Fig. 1.5. (A) Enzymatic reaction, (B) electrochemical regeneration of NAD⁺, and (C) E° for NAD⁺/NADH redox couple and oxidation potentials at a GC and a Pt electrode at pH 7.0.

Free - diffusing catalysts



Catalysts adsorbed on electrodes (monolayer)



Catalysts confined in polymer matrix on electrodes

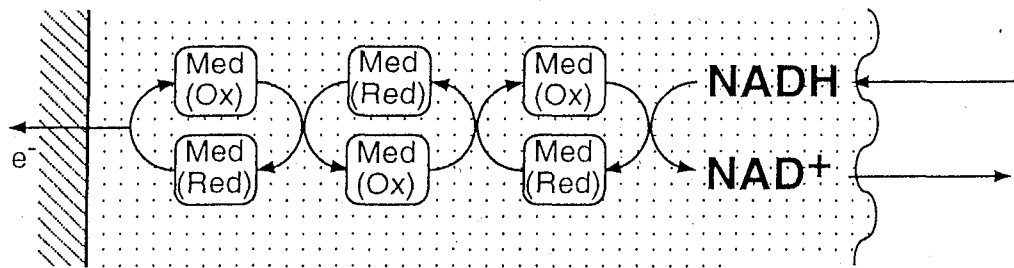


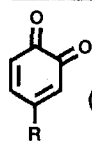
Fig 1.6: Three types of electron transfer mediator systems.

Redox Mediators For Accelerating Highly Irreversible Oxidation of NADH.

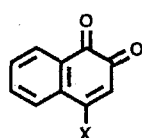
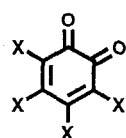
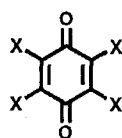
Metal Complexes

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, Ferrocene derivatives, etc.

Quinones

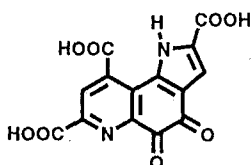


($\text{R} = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{NH}_2, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2, \dots$)



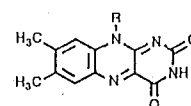
($\text{X} = \text{H}, \text{Cl}, \text{CH}_3, \text{CN}, \dots$)

($\text{X} = \text{H}, \text{SO}_3\text{Na}, \dots$)

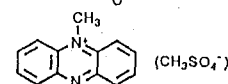


PQQ

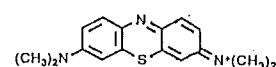
flavins



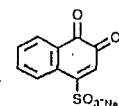
phenazines



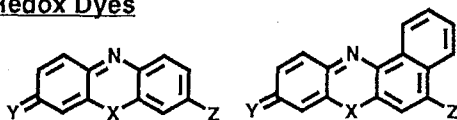
phenothiazines



ortho-quinones



Redox Dyes



[$\text{X} = \text{N}, \text{O}, \text{S}$; $\text{Y} = \text{O}, \text{N}^+\text{R}_2$; ($\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3, \dots$); $\text{Z} = \text{H}, \text{NH}_2, \text{NHR}$]

Organic Conducting Salts

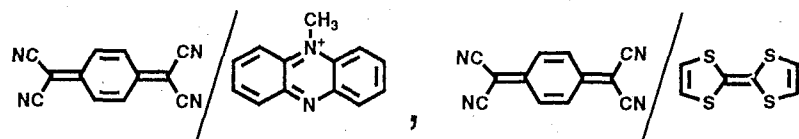


Fig 1.7: Redox mediators for accelerating highly irreversible oxidation of NADH.

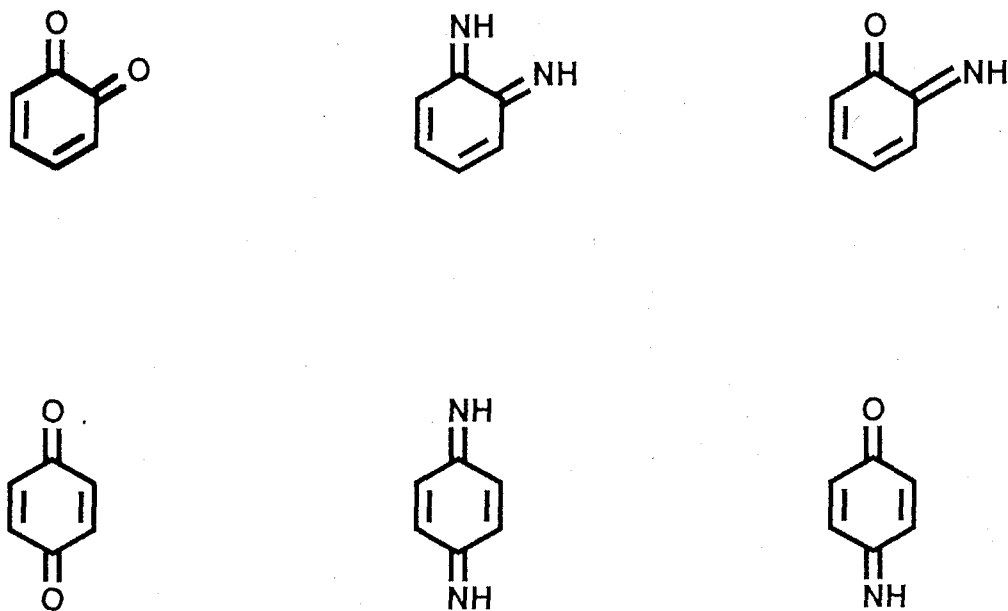


Fig 1.8: Basic structures of mediators for electrocatalytic oxidation of NADH.

第 2 章

フェノサフラニン色素誘導体の合成 およびキャラクタリゼーション

2.1 緒言

第4章で述べるように、0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中での NADH 補酵素の電極酸化に対して、アジン色素(チオニンおよびフェノサフラニン)の修飾電極が優れた触媒活性を有することが初めて明らかとなった。特にフェノサフラニンの式量レドックス電位 E° は、 NAD^+/NADH レドックス対の E° 値 ($-0.515 \text{ V vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd)}$) [37]) よりわずかに (約 60 mV) 正電位で、しかも触媒反応速度定数が $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と比較的大きい。色素の構造と触媒反応速度定数との相関関係を明らかにするために、第4章ではフェノサフラニン誘導体を用いてその NADH 触媒酸化反応速度定数について詳細に調べる。

第2章では、フェノサフラニン色素のレドックス活性サイト周辺の化学構造を変化させることにより電子状態を変え、その変化により式量レドックス電位や極大吸収波長がどのように変わるかを明らかにする。フェノサフラニンのレドックス活性サイトである N-アルキルフェナジニウム骨格の N 位に共有結合しているフェニル基のパラ位に電子供与性基(ここでは、メチル基、メトキシ基、イソプロピル基)および電子吸引性基(ここではニトロ基)を導入した色素は入手できないので、これを合成する。第1章で述べたようにフェノサフラニン誘導体が初めて市販されたのは1859年であり、Chemical Abstracts Vol.1 (1907年)[85]にも、その誘導体の合成の論文が多い。1882年にフェノサフラニンが単離され[8]、1972年に合成のメカニズムが初めて確立された[9]。しかしながら系統的なキャラクタリゼーションは行われていない。実際、フェノサフラニンの IR スペクトルは Aldrich IR ライブラリー [86] に記載されているが、

フェノサフラニンのNMRスペクトルはAldrich NMR ライブラリー[87]に記載されていない。本研究で合成したフェノサフラニン誘導体(メチル, メトキシ, イソプロピル, ニトロ誘導体)は, 新規化合物ではない[9]が, これらの色素のキャラクタリゼーションに関する報告は調べた限りでは存在しない。

2.2 実験

2.2.1 試薬

(フェノサフラニン誘導体) フェノサフラニン(Phenosafrafranine)(和光純薬工業株式会社, Aldrich Chem. Co.), サフラニン - O(Safranine O)(Chroma-Gesellschaft 社), メチレンバイオレット 3RAX(Methylene Violet 3RAX)(Aldrich Chem. Co.)を入手し, メタノール - ベンゼン混合溶媒(体積比1:4)を展開溶媒としてシリカゲルを用いた吸着クロマトグラフィーにより精製して用いた。インドインブルー(Indoine Blue)(Aldrich Chem. Co.), アゾカルミン G(Azocarmine G)(関東化学株式会社)は, 一級試薬をそのまま用いた。それぞれの構造式をFig.2.1に示す。市販で入手できるフェノサフラニン誘導体は, フェノサフラニンのアルキルフェナジニウム骨格に様々な置換基を持っている。

(フェノサフラニン誘導体合成用の試薬) *p*-フェニレンジアミン二塩酸塩(関東化学株式会社), アニリン塩酸塩(関東化学株式会社), $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業株式会社), *p*-トルイジン塩酸塩(*p*-メチルアニリン塩酸塩)(関東化学株式会社), *p*-アニシジン (*p*-メトキシアニリン)(和光純薬工業株式会社), *p*-イソプロピルアニリン(東京化成工業株式会社), *p*-ニトロアニリン(和光純薬工業株式会社), 酢酸ナトリウム(関東化学株式会社), 塩化ナトリウム(和光純薬工業株式会社)はそれぞれ, 特級試薬をそのまま用いた。

(支持塩) 塩化カリウム(関東化学株式会社), 過塩素酸ナトリウム(関東化学株式会社), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業株式会社), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業株式会社)は, 特級試薬をそのまま用いた。0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)は, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を46.56 g(0.13 mol), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を10.92 g(0.07 mol), それぞれ超純水に溶かして1000 mlの水溶液として調製した[88]。

(溶媒) メタノール(和光純薬工業株式会社), ベンゼン(和光純薬工業株式会社)は特級試薬をそのまま用いた。水として, 合成用には1次蒸留水を用いた。電気化学測定用には超純水(1次蒸留水をミリポア社製フィルターで濾過したもの)を用いた。

2.2.2 実験装置

この項で述べる実験装置および電極は、特に断らない限り全章にわたって同一である。NMRの測定では、JEOL社製270 MHz NMR装置(GSX-270)を用いた。紫外可視吸収スペクトルの測定は、日立U-3300を用いた。全ての電気化学測定は、3電極式によって行なった。作用電極としてBPG(Basal-plane Pyrolytic Graphite), GC(Glassy Carbon)を用いた。補助電極(対極)として白金巻線、基準電極として塩化カリウム飽和の銀/塩化銀電極を用いた。電気化学測定には以下の装置を用いた。分極ユニット(東方技研社製, PS-07)およびXYレコーダー(グラフテック社製, WX-2400)。回転円盤電極を用いた対流ボルタモグラムの測定には、上記に加えて回転電極装置(日厚計測社製, RRDE-1型), モータースピードコントローラー(日厚計測SC-5型)を用いた。コンピューター制御電解測定装置として, Model CS-1090(Cypress Systems, Inc., USA), およびBAS 100Bシステム(Bioanalytical Systems, Inc., USA)を用いた。全ての電気化学測定は特に断らない限り、窒素のバブリングにより溶存している酸素を脱気して窒素雰囲気下で測定を行なった。測定は実験室の室温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ で行なった。試料溶液のpH測定にはpHメーター(堀場製作所製, pH METER M-8)を用いた。

電極の作製法を述べる。BPG(Union Carbide社製, USA)の板からドリルで直径5.0 mmの円筒(0.2 cm^2)に切り出し、凸面を電極面とし、凹面をステンレス円筒のリードの先に銀ペースト(導電性樹脂材料ドータイト: 藤倉化成)で固定し、側面を熱収縮チューブ(INSULTITE-MW(架橋ポリオレフィン, 防水タイプ, 内層付き), Electronized Chemicals, USA)で絶縁したものを電極として用いた。アセトンで清澄にしたナイフで新しい電極面を測定毎に切り出して使用した。GC電極は回転電極用ディスク電極(日厚計測社製)を用いた。GC電極は琢磨用アルミナ(粒度 $1.0 \mu\text{m}$ および $0.06 \mu\text{m}$)で鏡面になるまで研磨し、その後、超純水中で超音波洗浄し、アルミナを除去した後、超純水で水洗して用いた。

2.2.3 パラアルキル置換フェノサフラニンの合成

インダミンを合成し、その後、*p*-置換アニリン誘導体を縮合させることによりフェノサフラニン誘導体を合成した。文献[14],[89],[16]を参考にして、*p*-置換アニリンを4種(*p*-メチルアニリン, *p*-メトキシアニリン, *p*-イソプロピルアニリン, *p*-ニトロアニリン)変えることにより目的の誘導体を合成した。*p*-位にメチル基を持つフェノサフラニン誘導体 $\text{CH}_3 - \text{PS}(3,7\text{-diamino-}$

5-(4-methyl-phenyl)-phenazinium chloride) の合成例を以下に示す。

1-5がインダミンの合成であり、6-12がインダミンへのアニリン誘導体の縮合である。

1. *p*-フェニレンジアミン二塩酸塩 (1.81 g, 10 mmol) とアニリン塩酸塩 (1.30 g, 10 mmol) を 200 ml の蒸留水に溶かした。
2. マグネティックスターラーで攪拌しながら、50 ml の蒸留水に溶かした 20 mmol の $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6 g) を徐々に加えた。
3. 5分以内に緑色の沈澱物が生成した。
4. これを直ちに磁性ブフナーロートで吸引ろ過した。
5. 単離せずに、上記のように合成したインダミンを十分に蒸留水で洗浄した後、2000 ml-三角フラスコの中で800 mlの蒸留水に分散させた。
6. 50 mlの蒸留水に溶かした *p*-トルイジン塩酸塩 (1.65 g, 11.5 mmol) を上記の溶液に加えた。
7. 40 ml の 3M (mol dm^{-3}) 酢酸ナトリウム溶液を上記の溶液に加えて、pH 5 にした。
8. その後で加温した。(沸騰すると、濃紺の溶液はよく泡を出した。)
9. 5分以内で、濃紺の溶液は赤紫色になった。
10. さらにおよそ5分後反応を止めて、冷めきらない熱溶液を磁性ブフナーロートでろ過した。ろ紙上には未反応のインダミンが残り、色素はろ液の熱水に溶けた。
11. 2 M になるように塩化ナトリウムをそのろ液に溶かし、冷蔵庫で一晩放置して色素を塩析させた。
12. 色素の粗生成物をろ紙上にろ別した。
13. さらに精製するために、シリカゲル上で吸着クロマトグラフィーを行った。展開溶媒として、メタノール-ベンゼン混合溶媒(体積比1:4)を用いた。

2.2.4 キャラクターゼーションの方法

元素分析を行なうとともに、 d^6 -DMSO 溶媒中でプロトンNMRスペクトル(270 MHz)を測定した。アルキル基を導入したフェノサフラニン誘導体のキャラクターゼーションは、精製した市販のフェノサフラニンと比較することによって行なった。フェノサフラニンの化学シフトやスピン結合定数と比較することにより、フェノサフラニン誘導体の同定を行なった。

合成したフェノサフラニン誘導体および市販で入手できるフェノサフラニン誘導体の可視紫外吸収スペクトルをエタノール溶媒中で測定し、極大吸収波長(λ_{\max})を評価した。また、サイクリックボルタンメトリーの測定から0.2 M リン酸緩衝溶液(pH7.0)中での式量レドックス電位を評価した。

2.3 結果および考察

以下、次の略号で色素を表す。

PS=phenosafranine=3,7-diamino-5-phenyl-phenazinium chloride

CH₃ - PS=3,7-diamino-5-(4-methyl-phenyl)-phenazinium chloride

CH₃O - PS=3,7-diamino-5-(4-methoxy-phenyl)-phenazinium chloride

isopropyl - PS=3,7-diamino-5-(4-isopropyl-phenyl)-phenazinium chloride

2.3.1 パラアルキル置換フェノサフラニンの収量および収率

p-置換アニリンを4種(*p*-メチルアニリン, *p*-メトキシアニリン, *p*-イソプロピルアニリン, *p*-ニトロアニリン)変えて合成したそれぞれのフェノサフラニン色素誘導体の粗生成物の収量および収率はそれぞれ, CH₃ - PS : 1.18 g (3.49 mmol) 34.9%; CH₃O - PS : 0.64 g (1.83 mmol) 18.3 %; isopropyl - PS : 0.45 g (1.25 mmol) 12.5 %; nitro - PS : 0.26 g (0.72 mmol) 7.2 % であった。

2.3.2 元素分析

合成したパラアルキル置換フェノサフラニンの元素分析の結果を Table 2.1 に示す。カラムクロマトグラフィーによって精製したものは、計算値と良い一致を示した。

Table 2.1. Elemental analyses of phenosafranine derivatives.

dye	C/%	H/%	N/%	Cl/%	Note
PS _{calc}	66.98	4.68	17.36	10.98	-
PS _{found}	62.78	4.42	15.98	10.81	a
CH ₃ - PS _{calc}	67.75	5.09	16.63	10.53	-
CH ₃ - PS _{found}	65.48	5.17	15.49	9.93	b
CH ₃ O - PS _{calc}	64.68	4.86	15.88	10.05	-
CH ₃ O - PS _{found}	63.23	4.72	15.61	9.45	b
isopropyl - PS _{calc}	69.13	5.80	15.36	9.71	-
isopropyl - PS _{found}	58.50	4.88	12.75	9.84	c

Note(a) : commercially available and chromatographically purified

Note(b) : synthesized and chromatographically purified

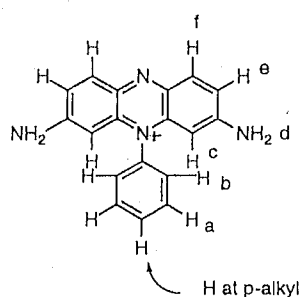
Note(c) : synthesized

2.3.3 H¹ - NMR

*d*⁶-DMSO 溶媒中でのプロトンNMR(270 MHz)の測定結果を Table. 2.2 にまとめた。それぞれ、求める構造をとっていることが明らかとなった。DMSO のメチル基のケミカルシフトと重なったため、CH₃ - PS のフェニル基上の *p*-位のメチル基の確認はDMSO 中ではできなかった。そこで、CH₃ - PS についてはCH₃OD 中でも測定を行なった。CH₃OD の温度を55℃に昇温して粘度を下げて測定することにより、アミノ基のブロードな吸収を観察することは出来なかったが、フェニル基上の *p*-位のメチル基を確認できた。

2.3.4 式量レドックス電位および極大吸収波長の測定

0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中でBPG電極を用いて、溶存フェノサフラニン誘導体のサイクリックボルタモグラム(Fig.2.2)を測定した。フェノサフラニン、サフラニン-O、メチレンバイオレット3RAX、及びインドインブルーは可逆なレドックス応答を示した。しかしながらアゾカルミンGの電極反応は非可逆であったので、電極触媒として用いることができないことがわかった。色素の濃度が1 mM では、Fig.2.2のようにいずれも還元電流の大きさが、酸化電流の大きさよりも小さいことがわかった。掃引速度の減少に伴い、(酸化ピーク電流値の絶対値/還元ピーク電流値の絶対値)の比が大きくなった。こ

Table 2.2. Chemical shifts of phenosafranine derivatives in *d*⁶-DMSO.

Dye	PS	CH ₃ - PS	CH ₃ O - PS
H at <i>p</i> -alkyl position	$\delta = 7.8$ ppm m, 1H	$\delta = 2.51$ ppm s, 3H	$\delta = 3.92$ ppm s, 3H
a,b	$\delta = 7.74$ ppm dd, 4H $J_1=61.495$ Hz $J_2=7.00$ Hz	$\delta = 7.58$ ppm dd, 4H $J_1=44.35$ Hz $J_2=8.08$ Hz	$\delta = 7.46$ ppm dd, 4H $J_1=44.52$ Hz $J_2=8.90$ Hz
c	$\delta = 5.83$ ppm d, 2H $J=1.97$ Hz	$\delta = 5.87$ ppm d, 2H $J=1.98$ Hz	$\delta = 5.91$ ppm d, 2H $J=1.98$ Hz
d	$\delta = 7.91$ ppm s, 4H	$\delta = 7.85$ ppm s, 4H	$\delta = 7.81$ ppm s, 4H
e	$\delta = 7.28$ ppm dd, 2H $J_1=9.23$ Hz $J_2=1.97$ Hz	$\delta = 7.25$ ppm dd, 2H $J_1=9.23$ Hz $J_2=1.98$ Hz	$\delta = 7.24$ ppm d, 2H $J_1=9.23$ Hz $J_2=2.31$ Hz
f	$\delta = 7.92$ ppm d, 2H $J=8.9$ Hz	$\delta = 7.92$ ppm d, 2H $J=9.23$ Hz	$\delta = 7.92$ ppm d, 2H $J=9.23$ Hz

のことは還元状態で還元生成物が電極に吸着していることを示唆している。電極を取り出して、色素を含まない0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中に移してサイクリックボルタモグラムを測定し、電極に吸着している色素レドックス対の式量レドックス電位を測定したのがFig.2.3である。(酸化ピーク電流値の絶対値/還元ピーク電流値の絶対値)の比がほぼ1であった。そこで、還元ピーク電位と酸化ピーク電位の midpoint 電位を式量レドックス電位とした。その結果をTable2.3にまとめた。合成したフェノサフラニン誘導体の式量レドックス電位 $E^{\circ'}$ は、フェノサフラニンの $E^{\circ'}$ に比べて負の値にシフトしたが、その変化は数十 mV 程度であった。負の値にシフトすることは、電子供与性基を導入することにより期待されたとおり、この色素を酸化しやすくなった結果である。

0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中でのフェノサフラニンの紫外可視吸収スペクトルを、第4章のFig.4.19に示した。合成したフェノサフラニン誘導体のエタノール溶液中での極大吸収波長 λ_{\max} は同様の吸収スペクトルを示し、エタノール中でのフェノサフラニンの極大吸収波長 (532 nm) とほとんど同じであった。これも、Table2.3にまとめた。

Table 2.3. Formal redox potential of phenosafranin derivatives in 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) and absorption maximum of phenosafranin derivatives in ethanol solution.

dye	$E^{\circ'}$ /V vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd)	λ_{\max} /nm	Note
Azocarmine G	—	—	—
Safranin O	-0.51	534.0	a
CH ₃ O-phenosafranin	-0.48	531.5	b
isopropyl-phenosafranin	-0.47	532.0	c
CH ₃ -phenosafranin	-0.47	531.5	b
Phenosafranin	-0.46	532.0	a
Methylene Violet 3RAX	-0.43	554.0	a
Indoine Blue	-0.33	589.0	d

Note(a) : commercially available and chromatographically purified

Note(b) : synthesized and chromatographically purified

Note(c) : synthesized

Note(d) : commercially available

この理由を考察するために、半経験的分子軌道法(MNDO-PM3法)により、これらの色素分子の安定構造を計算した。計算法の詳細は、第5章に載せたので、ここでは、結果のみを載せる。最安定構造の分子構造をFig. 2.4に示す。フェノサフラニンのフェニル基は、アルキルフェナジニウム骨格の窒素原子に結合し、この炭素-窒素結合は自由回転が可能である。そのため最安定構造は、フェニル基がアルキルフェナジニウム骨格平面に対して垂直になっている構造であることがわかった。つまり垂直なフェニル基により π 電子共役が色素分子全体に広がらないため、メチル基、メトキシ基、イソプロピル基、ニトロ基による影響が色素全体に広がらないと考えられる。このことがフェノサフラニンに対して式量レドックス電位は数十mVシフトするものの、極大吸収波長がほとんど同一であることの原因であると考えられる。

それぞれの分子のHOMO(最高被占軌道)、LUMO(最低空軌道)のエネルギー準位の計算結果は、第5章のTable 5.2の1-6である。1がサフラニン-O, 2が $\text{CH}_3\text{O}-\text{PS}$, 3が CH_3-PS , 4がフェノサフラニン(PS), 5がメチレンバイオレット3RAX, 6がインドインブルーにそれぞれ対応する。これらから明らかなように、インドインブルーのHOMO及びLUMOのエネルギー準位の値はフェノサフラニンの類縁体の中で大きく異なることがわかる。アルキルフェナジニウム骨格に直接置換基を導入した色素の場合、置換基による π 電子共役の変化を色素分子全体に広がらせることが可能であるため、結果として極大吸収波長や式量レドックス電位を大きく変えることにつながることがわかった。

2.4 結論

フェノサフラニンのフェニル基の

-位に対して、メチル基、メトキシ基、イソプロピル基、ニトロ基を導入したフェノサフラニン誘導体(CH_3-PS , $\text{CH}_3\text{O}-\text{PS}$, isopropyl-PS, NO_2-PS)を合成した。元素分析, H^1-NMR によりキャラクタリゼーションを行ない合成を確認した。サイクリックボルタンメトリーにより式量レドックス電位 $E^{\circ'}$ を、また紫外可視分光法により極大吸収波長 λ_{max} を測定した。フェノサフラニン誘導体に電子供与性基を導入することにより、 $E^{\circ'}$ は負の値にシフトしたが、その変化はフェノサフラニンと比べて数十mV程度であった。合成した誘導体の λ_{max} はフェノサフラニンのそれ(532 nm)とほとんど同じであった。半経験的分子軌道計算の結果、フェニル基がアルキルフェナジニウム骨格平面に対して垂直になっていることがわかった。このことがフェノサフラニン及びその誘導体の $E^{\circ'}$, λ_{max} がフェノサフラニンとほとん

と同じであることの原因であると考えることができた。その他のフェノサフラニン誘導体についても E^o 及び λ_{\max} を評価した。その結果, 約 $-0.3 \sim -0.5\text{V}$ の E^o , 及び $534 \sim 589 \text{ nm}$ の λ_{\max} を有するフェノサフラニン誘導体であることがわかった。

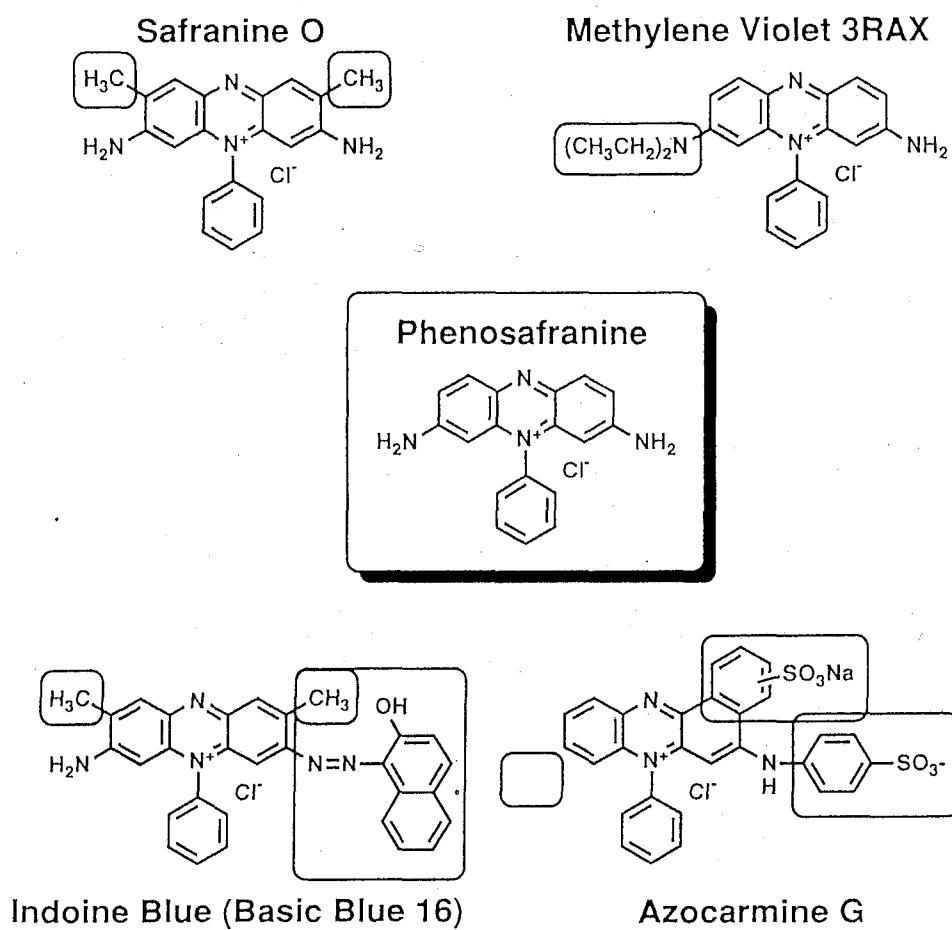


Fig 2.1: Structural formulas of phenosafranin derivatives.

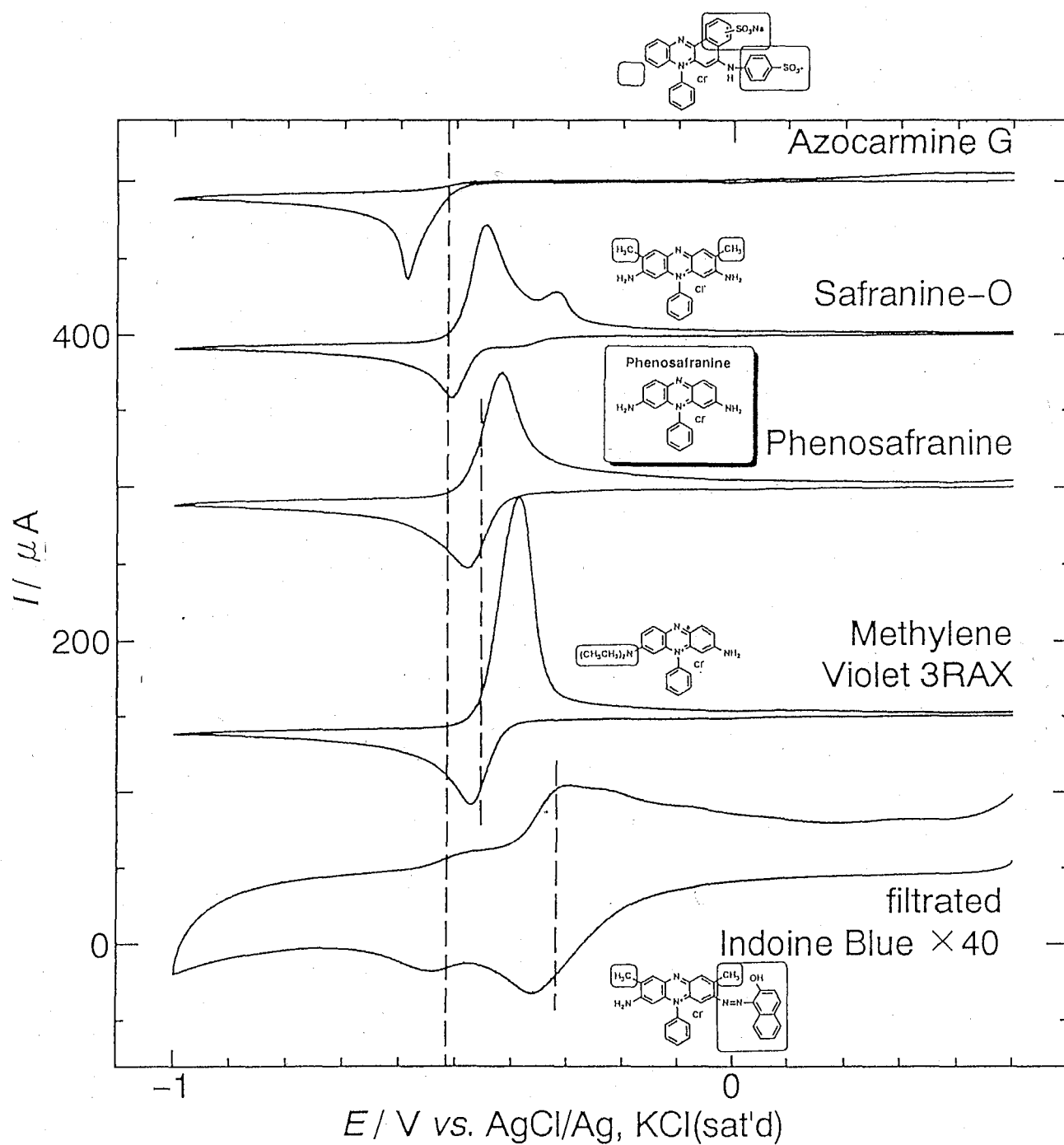


Fig. 2.2. Cyclic voltammograms of 1 mM phenoxyfranine derivatives in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7) at a bare BPG electrode at 25 °C. Potential scan rate : 50 mV s⁻¹.

	$E^{0'}$ vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd)	R ¹	R ²	R ³
Safranine O	(-0.51 V)	A, CH ₃	H	H
CH ₃ O-Phenosafranine	(-0.48 V)	B, H	H	CH ₃ O
CH ₃ -Phenosafranine	(-0.47 V)	C, H	H	CH ₃
isopropyl-Phenosafranine	(-0.47 V)	D, H	H	(CH ₃) ₂ CH
Phenosafranine	(-0.46 V)	E, H	H	H
Methylene Violet 3RAX	(-0.43 V)	F, H	CH ₃ CH ₂	H

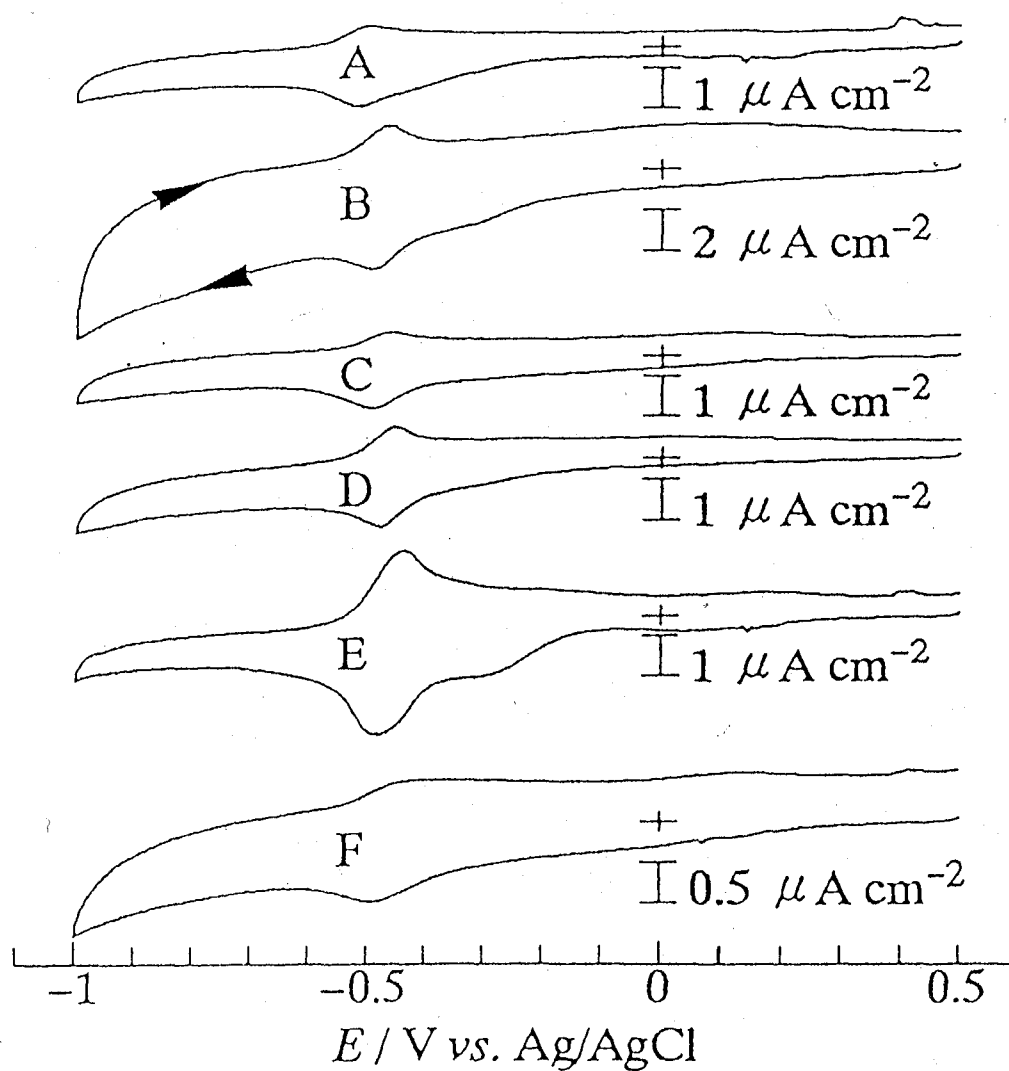
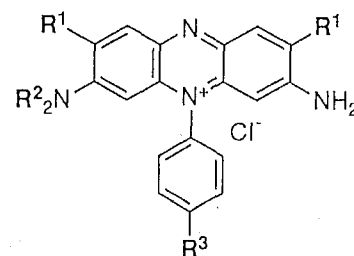
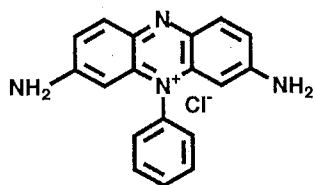
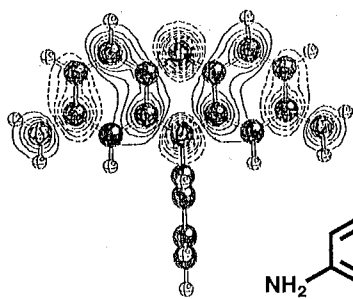
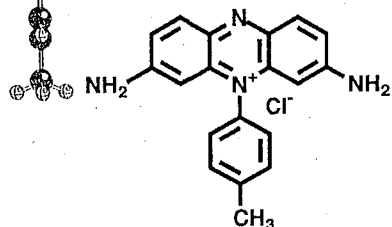
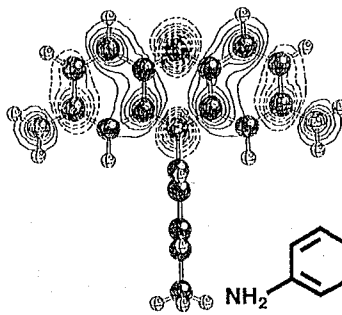
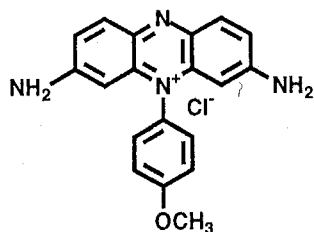
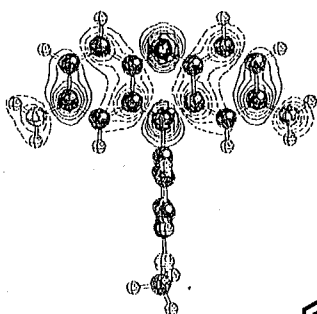
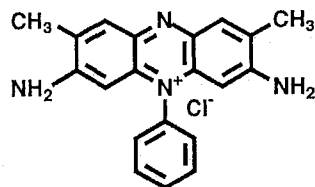
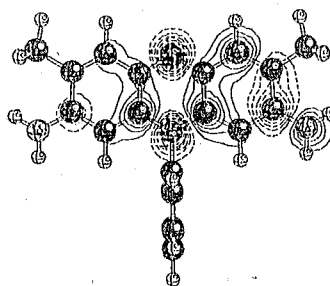


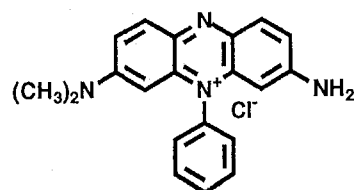
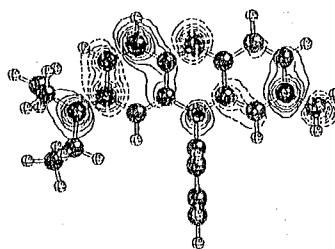
Fig. 2.3. Cyclic voltammograms of phenosafranine derivatives adsorbed at a bare BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) at 25 °C. Potential scan rate : 5 mV s⁻¹.



phenosafranin

 CH_3 -phenosafranin CH_3O -phenosafranin

safranin-O



methylene violet 3RAX

Fig. 2.4. The most stable structural formulas of phenosafranin derivatives in a vacuum system. Solid and broken lines represent contour maps of LUMO (lowest unoccupied molecular orbital).

第 3 章

アジン色素薄膜修飾電極の電解作製 およびそのキャラクタリゼーション

3.1 緒言

アジン色素のアミノ基の電解酸化によりアジン色素修飾電極を作製した結果について述べる。紫外可視分光法及びサイクリックボルタンメトリーを用いて薄膜修飾電極のキャラクタリゼーションを行なった。溶存アジン色素と電極上アジン色素の違いを明らかにするために、チオニン、フェノサフラニンに関して詳細に調べた。フェノチアジン、フェノチアジンの3位と7位にアミノ基を持つチオニン、及びフェノチアジンの3位と7位にジメチルアミノ基を持つメチレンブルーについて電解酸化を行ない、薄膜修飾電極作製にアミノ基の電解酸化が必要であることを明らかにした。

3.2 実験

3.2.1 試薬および実験装置

チオニン(東京化成工業株式会社)およびフェノサフラニン(和光純薬工業株式会社)は市販品を、メタノール-ベンゼン混合溶媒(体積比 1:4)を展開溶媒として、シリカゲル上で吸着クロマトグラフィーを行なって精製した。フェノチアジン(和光純薬工業株式会社)、メチレンブルー(Chroma Gesellschaft 社)はそれぞれ市販品をそのまま用いた。過塩素酸ナトリウムは市販品(関東化学株式会社, 特級)をそのまま用いた。アセトニトリルは市販品(関東化学株式会社, 特級)をモレキュラーシーブ 3A により予備脱水を行なった後、五酸化二リ

ンを添加して蒸留し、これに炭酸カリウムを加えて再蒸留したものを用いた。すべての電気化学測定は、3電極式によって行なった。作用電極はBPG(Basal-plane Pyrolytic Graphite)およびITO電極(In-Sn 酸化物導電性ガラス, 松崎真空社製, 表面抵抗: 約 $10 \Omega/\square$)を用いた。基準電極には, KCl飽和の銀/塩化銀電極[Ag/AgCl, KCl(sat'd)]を用い, 補助電極(対極)は白金巻線を用いた。実験装置は第2章で述べたのと同じものを用いた。紫外可視吸収スペクトルの測定は, 日立U-3300を用いた。

3.2.2 薄膜修飾電極の作製条件および評価条件

チオニン薄膜修飾電極の作製は, 0.1~10 mM のチオニンと0.2 M の過塩素酸ナトリウムを含むアセトニトリル溶液中または, チオニンと0.1 M の過塩素酸ナトリウムを含む pH 1.0 の水溶液中で電極に電位を印加することにより行なった。アセトニトリル中での電位掃引電解は

[水溶液中での基準電極(Ag/AgCl, KCl(sat'd))/ KCl飽和水溶液の液絡/ KCl飽和水溶液/ 0.2 M 過塩素酸ナトリウム を含むアセトニトリル溶液の液絡/ 1 mM チオニンおよび 0.2 M の過塩素酸ナトリウムを含むアセトニトリル溶液]

という電解セル系を構成して行なった。薄膜修飾電極の評価は, 主にトリフルオロ酢酸ナトリウムを含む pH 1.0 の水溶液 (0.1 M $\text{CF}_3\text{COOH} + \text{CF}_3\text{COONa}$, pH 1.0) および 0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中に行なった。

3.3 結果および考察

3.3.1 電解作製チオニン修飾電極

第1章で述べたように, 光ガルバニ電池への応用の観点からチオニン薄膜修飾電極は詳細に調べられてきている [90]。電極上チオニン薄膜のキャラクタリゼーションに関して, これまでに報告されている例を挙げる。酸性水溶液中で電解重合法により作製した薄膜のキャラクタリゼーションに Raman スペクトルが用いられ [91], チオニンのアミノ基の窒素原子とチオニンの芳香環の炭素原子が結合して生成する2級アミンの構造, すなわち (CNC) 結合でチオニン同士が結合していることが確認されている [91]。0.05 M 硫酸水溶液中 +1.2 V vs. SCE の定電位で数分間チオニンを BPG 電極で酸化した後還元方向に電位掃引して得た時のチオニンのレドックスピークと, BPG 電極上に吸着させたチオニンのレドックスピークとの差異に注目して, チオニン吸着分子の配向

に関して定性的な解釈も行なわれている [92]。吸着チオニンと溶存チオニンの式量レドックス電位を pH 1 から pH 11 の緩衝溶液中で測定した結果、中性からアルカリ性の水溶液中において吸着チオニンの式量レドックス電位が溶存チオニンのそれよりおよそ 50 mV 正電位側にあるという現象も報告されている [93]。

ここでは、これまでに調べられていないチオニン薄膜修飾電極の作製法、薄膜の形状、比伝導率についてチオニン薄膜のキャラクターゼーションを行なった結果について述べる。

3.3.1.1 定電位電解法による薄膜修飾電極の作製

Albery らは、白金電極上、チオニンを含む酸性水溶液中で定電位電解を行なうことにより薄膜修飾電極が作製できることを報告している [93]。ここでは、その方法の追試を行なうとともに、定電位電解法と電位掃引電解法を組み合わせた結果について述べる。Fig. 3.1 に示すように、 $2.7 \times 10^2 \mu\text{M}$ のチオニンと 0.1 M NaClO_4 を含む pH 1.0 の水溶液中で、+1.245 V vs. Ag/AgCl (= +1.20 V vs. SCE) を開始電位として、 50 mV s^{-1} で 1 回のみ電位掃引電解を行なった (開始電位 = +1.245 V, 折り返し電位 = -0.155 V, 停止電位 : +1.245 V)。電位掃引の後、再び +1.245 V で定電位電解を 3 分間行なった。その後同様に 1 回の電位掃引電解を行ない、次に 10 分間 +1.245 V で定電位電解した。定電位電解の時間を長くするとピーク電流値が増加することは、電位掃引により酸化還元を受ける色素の量が増加していることを意味する。溶液中の色素濃度は一定であるので、このような電流値の増加は電極に付着し成長し続ける薄膜の存在を意味する。このようにして、薄膜の成長を電位掃引電解により確認しながら定電位電解を合計 23 分間行なった。Fig. 3.3(C) に示すように、この修飾電極は電気化学的に活性であることがわかった。

3.3.1.2 電位掃引電解法による薄膜修飾電極の作製

繰り返し電位掃引電解を行なうことによってもチオニン修飾電極を作製できた。例えば Fig. 3.2 は、 $60 \mu\text{M}$ のチオニンと 0.1 M NaClO_4 を含む pH 1.0 の水溶液中で、ITO 電極を用いて -0.155 V と +1.245 V の間で、およそ 60 分間にわたって 60 回電位掃引した時に得たサイクリックボルタモグラムである。この場合ピーク電流値は増加し続けたので、電位掃引電解により電極上へチオニン薄膜が成長していることが示唆された。この薄膜の膜の厚さ、形状については、次の節以降に述べる。

Fig. 3.3(A)には、40 μM のチオニンと0.1 M NaClO_4 を含むpH 1.0の水溶液を調製し、BPG電極上で、(開始電位: -0.155V , 折り返し電位: $+1.245\text{V}$)の間でおよそ90分にわたって98回電位掃引した時に得たサイクリックボルタモグラムのうち、いくつかのボルタモグラムを示す。Fig. 3.3(A)で得られた薄膜修飾電極を水洗後、色素を含まない酸性水溶液(0.1 M $\text{CF}_3\text{COOH} + \text{CF}_3\text{COONa}$, pH 1.0)中で 50 mV s^{-1} で電位掃引したボルタモグラムがFig. 3.3(C)の右の点線である。この後、色素を含まない0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中で電位掃引したボルタモグラムがFig. 3.3(C)の左の点線である。pH 1, pH 7それぞれの溶液で、チオニン修飾電極は可逆な酸化還元応答を示した。pHによって酸化ピーク電位および還元ピーク電位が異なる理由は、チオニンの酸化還元にプロトンが関与することを示している。チオニン修飾電極は、吸着電極、薄膜修飾電極ともにpH 1で(電子:プロトン)=(2:3), pH 7で(電子:プロトン)=(2:1), が関与することがAlberyらによって報告されている[93]。Fig. 3.4に、彼らによって提案されているチオニンのレドックス応答を示す[93]。

チオニンは熱水にはよく溶けるものの水溶液に対する溶解度は低く0.1 mM程度しか溶解しない。そのため、水溶液系での修飾電極作製では $10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ 程度の表面被覆量を得ようとするると1時間以上かかった。そこで本研究では、アニリン等の電解重合[80]で行われているのと同様に、0.2 M NaClO_4 を含む非水溶媒(アセトニトリル)中でチオニンを電位掃引電解することにより簡便に表面被覆量を増加させることを試みた。アセトニトリル中でのチオニンの電解作製薄膜については、BauldreyとArcherら[94]が予備的な実験について報告しており、少なくとも $100 \mu\text{C cm}^{-2}$ ($5.2 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$)の被覆量の薄膜が生成することが知られている。しかしながら、薄膜作製の条件の詳細な検討は行われていない。

1 mMのチオニンと0.2 M NaClO_4 を含むアセトニトリル溶液中で、 -0.8V と $+1.8\text{V}$ の間でBPG電極上で10回電位掃引した時に得たサイクリックボルタモグラムをFig. 3.3(B)に示す。第1掃引波において $+1.7\text{V}$ において酸化電流が観測されるが、その酸化反応に対応する還元電流は観測されなかった。その結果、非可逆な酸化反応が観測された電位よりも負電位側にブロードな酸化還元応答が新たに観測され、そのピーク電流値は繰り返し電位掃引をすることによって増加した。

薄膜マトリックス中に残っているチオニンを除く目的で、BPG電極上に生成したチオニン薄膜を超純水で水洗後、沸騰させた超純水の中に1分程度浸した。その後、常温の超純水の中で電極を冷ましてから色素を含まない酸性水溶液(0.1 M $\text{CF}_3\text{COOH} + \text{CF}_3\text{COONa}$, pH 1.0)中で電位掃引して得たCVが

Fig. 3.3(C)の右の実線である。この後、色素を含まない0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中に浸して電位掃引して得たCVがFig. 3.3(C)の左の実線である。それぞれの応答は、電位掃引を繰り返して酸化還元応答が安定した後の応答である。Fig. 3.3(C)より、水系・非水系のどちらで作製しても生成したチオニン薄膜修飾電極の式量レドックス電位 E^0 に差異がないことがわかった。このことは、溶媒が異なっても電解酸化されて生成する薄膜の電気化学的応答については差が現れないことを意味している。Fig. 3.3(C)で、同じpHのときの波線と実線のCVを比較してわかるように、10 mM チオニンを含むアセトニトリル溶液で電位掃引電解を行なうことにより、酸性水溶液中でよりも短時間に $10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$ のオーダーの表面被覆量(Γ)の薄膜修飾電極を作製することができた。Fig. 3.5に電位掃引回数と生成する薄膜の Γ の関係を示した。 Γ は、チオニンを含まない支持塩溶液中で電位を 5 mV s^{-1} で電位掃引し、ボルタモグラムを積分することにより求めた。電位掃引回数により、表面被覆量 Γ を任意に制御できることがわかった。

水系と同様にアセトニトリル系でもまた定電位電解法によって修飾電極の調製が可能であった。クーロンメーターを用いて酸化反応で消費される電気量(通電量)を測定しながら、電位を+1.8Vに保持して電解を行なった。チオニン修飾BPG電極上を超純水で水洗後、沸騰している超純水の中に1分間浸漬し、薄膜マトリックス中に残っているチオニンを除いた。常温の超純水の中で電極を冷ましてから、電気化学的活性サイトの表面被覆量 $\Gamma(\text{mol cm}^{-2})$ を求めた。通電量 Q と Γ との間の相関性をFig. 3.6に示した。140 mC cm^{-2} 程度までは、良い直線性を示すことがわかった。

3.3.1.3 アミノ基の酸化とチオニン修飾電極の表面被覆量の関係

チオニンについて、電位掃引範囲によってもまた Γ の制御ができることがわかった。Fig. 3.7は、10 mM のチオニンを含むアセトニトリル中で作製した薄膜の Γ の違いを示す。+0.7Vまでの電位掃引(●)では、 $10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ オーダーのチオニンが電極上へ保持されるのに対して、+1.4Vまで電位掃引(●)するとチオニンの Γ が飛躍的に増大して、 $10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ オーダーのチオニンが電極上へ保持された。電位掃引時間を長く(■, 50分間)することによってもまた、 Γ の増大は観察された。プロトン供与体であるトリフルオロ酢酸の存在(◎)により同じ電位掃引範囲、同じチオニン濃度(○)でも Γ が1.5倍増大した。これらの結果が示唆することは、アミノ基のカチオンラジカル種の発生が薄膜生成の重要な素過程であり、カチオンラジカルの濃度が増大することが Γ の増大に寄与することである[94]。アミノ基の寄与を確かめるために、フェノ

チアジン, フェノチアジンの3位と7位にアミノ基を持つチオニン, フェノチアジンの3位と7位にジメチルアミノ基を持つメチレンブルー, それぞれについて電解酸化を行ない, アミノ基の電解酸化と表面被覆量との関係を明らかにした。

フェノチアジン 10 mM と 0.2 M の NaClO_4 を含むアセトニトリル溶液中で電位掃引(-0.8 V から+1.8 V までの繰り返し電位掃引, 電位掃引速度 50 mV s^{-1} で 10 回電位掃引) することにより, フェノチアジンを電極上に保持することができた。フェノチアジンに対しては熱湯処理を行わずに, フェノチアジンを含まない 0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中で 10 分程度電位掃引した後測定した表面被覆量は $5.4 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ であった (Fig. 3.8(a))。

一方, 10 分の 1 の濃度のチオニンをフェノチアジンと同じ電位掃引範囲 (-0.8 V から+1.8V までの繰り返し), 同じ電位掃引速度 (50 mV s^{-1}) で, 同じ電位掃引回数 (10 回) 電位掃引した。チオニンは熱湯処理を 1 分間行ないモノマーを除去し, チオニンを含まない 0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中で 90 分間電位掃引した。このようにチオニンに関しては積極的にモノマーを除去したにも関わらず, 電極上に保持された電気化学的活性サイトの量はチオニンの方が多く, チオニンが $5.4 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ (Fig. 3.8(b)) で, フェノチアジンは $5.4 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ (Fig. 3.8(a)) であることがわかった。すなわちチオニンは電解溶液の色素濃度が 10 分の 1 であったにも関わらず表面被覆量がフェノチアジンの 10 倍大きいことがわかった。すなわちアミノ基の酸化の重要性が示唆された。

チオニンとメチレンブルーでの結果を比較することにより, アミノ基と N,N-ジメチルアミノ基の差を述べる。チオニンとメチレンブルーをそれぞれ同じ濃度 (どちらも 10 mM のチオニンのみまたはメチレンブルーのみと 0.2 M の NaClO_4 を含むアセトニトリル溶液), 同じ電位掃引範囲 (-0.8 V から+1.4 V までの繰り返し), 同じ電位掃引速度 (50 mV s^{-1}) で, 同じ電位掃引回数 (10 回) 電位掃引電解を行なった。チオニン, メチレンブルーどちらも熱湯処理を 1 分間行ないモノマーを除去し, 色素を含まない 0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中で 60 分間電位掃引した。その結果得た修飾電極のサイクリックボルタモグラムをチオニンについては Fig. 3.9(a) に, メチレンブルーについては Fig. 3.9(b) に示した。チオニン, メチレンブルーの電位掃引電解では, $10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ のオーダーで色素を修飾できることがわかった。

以上をまとめるとフェノチアジンについては, チオニン, メチレンブルーの 10 分の 1 程度の量しか電極上へ保持されないことがわかった。以上より, チオニン, メチレンブルーが電極上へ保持されるのはアミノ基, N,N-ジメチル

アミノ基の電解酸化に起因すると考えることができる。Fig. 3.10, Fig. 3.11それぞれの図の(a)は、チオニン、メチレンブルーそれぞれ 10 mM と 0.2 M の NaClO_4 を含むアセトニトリル溶液中で作製したチオニン吸着電極、メチレンブルー吸着電極のサイクリックボルタモグラムである。すなわち「電位をかけない状態で電極を 900 rpm で回転しながら色素溶液に1分間浸漬した後、熱湯処理を1分間行ない弱く吸着している色素分子を除去し、色素を含まない 0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中で 60 分間電位掃引した後」に得たボルタモグラムである。また、Fig. 3.10, Fig. 3.11それぞれの図の(b)は、 -0.8V (チオニンについては -0.2V) から $+1.4\text{V}$ までの 10 回の繰り返し電位掃引で電解酸化を行ない、熱湯処理を1分間行ない弱く吸着している分子を除去し、色素を含まない 0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中で 60 分間電位掃引した後のものである。チオニンについては $3.1 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ 保持され、メチレンブルーは $2.5 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ 保持された。前項で述べたとおり、電解酸化を行なうことによりレドックス活性サイトを電極上へ保持させることができることが確かめられた。以上の Fig. 3.10, Fig. 3.11の2つの図の -0.05V 付近のレドックス対は、以下に示すようなレドックス応答 (Fig. 3.12) に対応すると考えることができる。すなわち、フェノチアジン、チオニンおよびメチレンブルーそれぞれのレドックス応答はフェノチアジン骨格に由来し、アミノ基はオリゴマーの主鎖を形成するのに重要である、と考えることができる。

3.3.1.4 チオニン薄膜修飾電極の形状

第4章で述べるように、触媒反応機構の解析を厚い薄膜に対しても行なう (第4章では、単分子層レベルの薄膜のみの解析を行なう) ためには、均一の厚さ、均一のレドックス活性サイトの濃度分布を有する薄膜を用いることが理想である。ここでは、電解生成薄膜の厚さ (膜厚, ϕ) を次のようにして測定した。ITO 電極をキムワイプで清澄にして絶縁テープ (Scotch Kapton Film tape, 5413 (3M)) で電極の表面部分を覆い絶縁し、 0.2 cm^2 の電極面積に規定し、膜厚測定用電極とした。この ITO 電極にチオニン薄膜を電解生成させ、水洗後風乾した。風乾後テープだけをはがし、表面粗さ測定器 (Sloan 社製, DEKTAK 3030) を用いて、電極基板と膜表面との平均段差を測定し、膜の厚さとした。典型的な測定結果を Fig. 3.13 に示す。スパイク状のプロフィールは、ゴミ、チリ、乾燥した支持塩に衝突して、プローブが飛び上がってしまうことによる。

1.0 mM チオニンと 0.2 M NaClO_4 を含むアセトニトリル溶液中で ITO 電極上で、(電位掃引範囲: -0.8V から $+1.8\text{V}$ vs. Ag/AgCl , $\text{KCl}(\text{sat'd})$, 電位掃引速度: 50 mV s^{-1}) という条件で電解酸化を行なったところ、電位掃引

回数 n と Γ (Fig. 3.14), 電位掃引回数 n と膜厚 (ϕ) (Fig. 3.15) にそれぞれに相関性があったので Γ と膜厚の間に検量線が書けた (Γ vs. ϕ) (Fig. 3.16)。この傾きから薄膜内のチオニンの体積濃度 C は, $\Gamma/\phi = 0.15 \text{ M}$ であることがわかった。

3.3.1.5 チオニン薄膜の比伝導率 κ の測定

導体中の抵抗 $R(\Omega)$ は, 次式で表される, $R = \rho l/A$ 。ただし, ρ (単位, $\Omega \text{ cm}$) は比抵抗, $l(\text{cm})$ は導体をはさんだ2つの電極間の長さ, $A(\text{cm}^2)$ は2つの電極間の断面積である。電気伝導率 L は, 抵抗 R の逆数として表される, $L = 1/R$ 。 $L = \kappa A/l$ 。 κ は比伝導率であり, 単位の長さの立方体の導体の電気伝導率である。チオニン薄膜の導電性を比伝導率の測定により評価した。

チオニン薄膜の比伝導率の測定は2端子法で行なった。Scotch Kapton Film tape 5413(3M, USA) を貼って窓を開けたBPG電極に, 電位掃引電解によりチオニン薄膜 ($\phi = (0.37 \pm 0.04) \mu\text{m}$, 膜の面積: 0.05 cm^2) を作製した。この電極を水銀に浸し, 白金コイルをリードとして2電極系とし, 21°C で $0 \sim 100 \text{ mV}$ の電位差をかけて電流値を測定した。結果を Fig. 3.17に示した。良い直線性を示し傾きは 0.852 mA/mV であり, $L = 0.852 \text{ S}$ であることがわかった。定義式より比伝導率を計算すると, $\kappa = Ll/A = 0.852 \times (0.37 \pm 0.04) \times 10^{-4} / 0.05 = (6.3 \pm 0.7) \times 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$ となった。電解重合ポリ(*o*-フェニレンジアミン)膜(酸化体)の κ は $(2.0 \pm 1.0) \times 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$, ポリ(*N*-メチルアニリン)膜(酸化体)の κ は $(3.0 \pm 1.0) \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ と報告されている [95]。チオニン薄膜は, アニリン誘導体より, 導電性が1桁小さい半導体であることがわかった。

3.3.1.6 電位掃引による色素の吸着状態の変化- Γ 増大の機構-

BPG電極に吸着したチオニン, メチレンブルーを, 色素を含まない 0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中で電位掃引すると, 色素の酸化還元ピーク電位が正電位へシフトする現象が観測された。これは電位掃引による色素の吸着状態の変化を示唆するので興味深い。その現象について説明する。チオニンとメチレンブルーについてそれぞれディップ(dip)法(電位をかけない状態で色素溶液に電極を浸漬する方法)により吸着させた電極を熱湯処理して余分な色素(チオニン, メチレンブルー)を除去した。色素を含まない 0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中に浸し, しばらく -0.6 V に保持した後, 50 mV s^{-1} で電位掃引を開始した。 $+0.7 \text{ V}$ との間を2回電位掃引して, 得られたのがそれぞれ Fig. 3.18の(a), Fig. 3.19の(a)である。次に, 電位掃引範囲を $+0.9 \text{ V}$ にまで広げ, 一度目の電位掃引は記録しないで, 二度目の電位掃引の時のボルタモグラムを測定し

た (Fig. 3.18の (b), Fig. 3.19の (b))。90分電位掃引し続けた後は、もとの -0.25 V 付近のピークが消え新しい -0.05 V 付近のピークが現れた (Fig. 3.18の (c), Fig. 3.19の (c))。電位掃引範囲を $+0.7$ V までに制限していた場合 (Fig. 3.20(b)) もとの -0.25 V 付近のピークは残ったままであった。Fig. 3.21(a)は、 $+0.9$ V までの電位掃引を行なう前のボルタモグラムであり、Fig. 3.21(b)は、90分間、電位掃引を行なった後のボルタモグラムである。電位掃引後のボルタモグラムの形状は、ピークがブロードになっておりチオニン薄膜修飾電極 (Fig. 3.10(b)) のボルタモグラムの形状に似ていることがわかった。

SNIFTIRS (Subtractively Normalised Interfacial Fourier Transfer InfraRed Spectroscopy) により、同じ条件でチオニンを金ディスク電極に吸着させ電位掃引を行ない、チオニンの酸化還元ピーク電位が正電位へシフトする現象を IR 差スペクトルで測定した。電位掃引の結果、 -0.4 V と $+0.4$ V の間でのチオニンの酸化および還元により可逆的に変化する構造が新たに現れた。その赤外吸収の波数は、 1160 cm^{-1} と 1380 cm^{-1} であることがわかった。チオニン自身の赤外スペクトルのアサインメントが複雑で困難である [86] ため、この電位掃引による新しい分子骨格に関する構造は推定できなかったが、電位掃引電解と薄膜の生成とが密接な関係にあることが初めて明らかとなった。

3.3.2 電解作製フェノサフラニン修飾電極

フェナジン色素フェノサフラニンは、フェナジンメトサルフェートと同じアルキルフェナジニウム骨格を持つので同様の酸化還元能が期待される。フェノサフラニン色素修飾電極に関する報告は初めてであるので、フェノサフラニンの電気化学的な基礎物性が調べられていない。そこで、回転円盤電極を用いる対流ボルタンメトリーにより、この色素の拡散係数と不均一電子移動反応速度定数を求めた。その後、電解作製フェノサフラニン修飾電極の作製、および電気化学的、分光学的キャラクターゼーションについて述べる。

3.3.2.1 フェノサフラニンの拡散係数

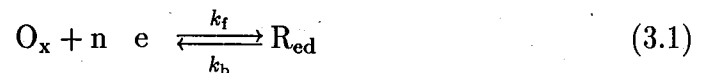
0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中における回転円盤電極を用いた対流ボルタンメトリーにより 0.05 , 0.1 , 0.2 mM の3種類の濃度について、Levich プロットの傾きから拡散係数を求めた。フェノサフラニンの対流ボルタモグラムを Fig. 3.22に示す。第2章の Fig. 2.2から明らかのように、 1 mM の濃度ではサイクリックボルタモグラムの酸化ピーク電流値の絶対値 i_p^a と還元ピーク電流値の絶対値 i_p^c の比は $i_p^a/i_p^c > 1$ であった。すなわち還元すると色素が電極に吸着し、

再酸化することにより電極から脱着する現象が見られた。そこで、 $i_p^a/i_p^c = 1$ とみなせるような、より低い濃度条件でフェノサフラニンの拡散係数を測定する必要があった。

0.05, 0.1 および 0.2 mM の3種類の濃度に対する限界電流値の電極の回転数の平方根に対する傾きは、Fig. 3.23より、3.53, 6.54, $13.1 \times 10^{-6} \text{ A cm}^{-2}(\text{rad s}^{-1})^{-1/2}$ と求められ、Levich式によりフェノサフラニンの拡散係数は、 $D = (4.08 \pm 0.15) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ であると評価された。

3.3.2.2 フェノサフラニンの不均一電子移動反応速度定数

電子移動メディエーターの機能として、電気化学的に可逆であること、すなわち電子移動メディエーターの電極反応が基質のメディエーション酸化反応の律速段階にならないことが必要である。そこで、不均一電子移動速度定数を測定した。



式3.1において、 k_f は還元反応の電極反応速度定数であり、 k_b は酸化反応の電極反応速度定数である。

$$k_f = k^0 \exp[-\alpha nF(E - E^{\circ})/RT] \quad (3.2)$$

ここで、

k^0 : 標準電極反応速度定数 (cm s^{-1})

α : 還元反応の移動係数

n : 反応電子数(フェノサフラニンの場合, $n=2$)

F : ファラデー定数 (96485 C mol^{-1})

E : 電極電位 (V)

E° : 式量レドックス電位 (V)

R : 気体定数 ($8.3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T : 絶対温度 (K)(ここでは, $296.15 \text{ K}(23 \text{ }^{\circ}\text{C})$)

である。式(3.2)の対数をとると、式3.3となる。

$$\log k_f = \log k^0 - \alpha nF(E - E^{\circ})/(2.303RT) \quad (3.3)$$

フェノサフラニンの式量レドックス電位付近の電位領域のLevichプロットを、Fig. 3.24に示す。このデータをKoutecky-Levichプロットしたものが、Fig. 3.25

であり、切片から各電位での k_f が評価された。式(3.3)に従い、 $\log k_f$ を $(E - E^0)$ に対してプロットしたのが、Fig. 3.26である。このプロットの切片および傾きから α および k^0 が $\alpha = 0.65$ 、 $k^0 = 7.6 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ と評価された。このように、フェノサフラニン色素の不均一電子移動反応は、ほぼ準可逆[96]であることがわかった。よって、フェノサフラニンを電子移動メディエーターとして用いることができることがわかった。

3.3.2.3 電位掃引電解法による薄膜修飾電極の作製

Fig. 3.27(A)に、1 mM のフェノサフラニンと0.1 M 過塩素酸ナトリウムとを含むpH 1.0の酸性水溶液中におけるフェノサフラニンの電位掃引電解のボルタモグラムを示す。+1.0 V以上の電位範囲で非可逆な酸化電流が観測され、対応する還元電流は観測されなかった。-0.1 V付近の薄膜のレドックス応答に対応する電流が、酸化電流および還元電流ともに時間とともに増加した。この電極を超純水で洗浄し、pH 1.0の過塩素酸ナトリウム水溶液に浸漬させて得たサイクリックボルタモグラムをFig. 3.27(B)-1に示した。10 mM フェノサフラニンをアセトニトリル中でFig. 3.27(A)と同様の電位掃引電解を行なったボルタモグラムFig. 3.28に示す。アセトニトリル中での電位掃引電解では、チオニンと同様にフェノサフラニンの表面被覆量を増大することができた。この電極を超純水で洗浄し、pH 0.92の過塩素酸ナトリウム水溶液に浸漬させて得たサイクリックボルタモグラムをFig. 3.27(B)-2に、1 Mの過塩素酸ナトリウムを含むpH 7.0の緩衝溶液に浸漬させて得たサイクリックボルタモグラムをFig. 3.27(B)-3に、それぞれ示した。pHによって酸化ピーク電位および還元ピーク電位が異なる理由は、フェノサフラニンの酸化還元にプロトンが関与することを示している。そのpHの変化に対する挙動は、次節に述べる。

Fig. 3.29に、フェノサフラニン吸着電極と、フェノサフラニン薄膜修飾電極の表面被覆量の差異を表すサイクリックボルタモグラムを示す。電位掃引電解の結果、 $1.07 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$ の表面被覆量が得られた。以上のように、フェノサフラニンもチオニンと同様に電位掃引電解により容易に薄膜修飾電極を作製することができた。

3.3.2.4 フェノサフラニン色素の平衡論

フェノサフラニン修飾電極の作製は本研究が初めてである。よって溶存色素および薄膜状の色素のどちらとも電気化学的キャラクタリゼーションが行わ

れていない。そこで、溶液のpHを1から12まで広く変えてサイクリックボルタモグラムの測定を行ない、 E° のpH依存性を調べた。その結果をFig. 3.30に示した。pH7では薄膜状のフェノサフラニンは2組のレドックスピーク対を有する(Fig. 3.31(a))のに対して、溶存しているフェノサフラニンは1組のレドックスピーク対を有する(Fig. 3.31(b))ことがわかった。これらについては、第3.3.2.5節で述べる。

各々のpHで、関与している電子とプロトンの比がどのような酸化還元反応が起こっているのかを調べることを目的として、Fig. 3.30の酸化ピーク電位と還元ピーク電位の midpoint 電位を式量レドックス電位とみなして、pHに対してプロットしたのがFig. 3.32である。2 M 塩化カリウムを含む 50 mM の緩衝溶液 200ml(pH 2, pH 4, pH 6, pH 7, pH 8, pH 10, pH 11)を作製し、それぞれの緩衝溶液の(pH \pm 1)の範囲で測定を行なった。2 M 塩化カリウムが存在するので、KOH濃厚溶液やHCl濃厚溶液をビュレットで滴下してpHを変化させてもイオン強度は一定[97]とみなせる。

Fig. 3.32(a)は溶存フェノサフラニン(O)であり、Fig. 3.32(b)は電極上フェノサフラニン薄膜(●)であった。Fig. 3.32(c)はフェナジンメトサルフェート(◆)の文献値[98]である。実線で書いた補助線は、 $-30 \text{ mV}/\Delta\text{pH}$ 、 $-60 \text{ mV}/\Delta\text{pH}$ 、 $-90 \text{ mV}/\Delta\text{pH}$ の傾きをもち、それぞれ(電子:プロトン)=(2:1)、(2:2すなわち1:1)、(2:3)が関与する酸化還元反応であることを示す[99]。

溶存フェノサフラニン(O)では、pH 1–pH 4.3で(電子:プロトン)=(2:3)、pH 4.3–pH 6.6で(電子:プロトン)=(1:1)、pH 6.6–pH 12で(電子:プロトン)=(2:1)であることがわかった。一方、電極上フェノサフラニン薄膜(●)では、pH 1–pH 2.9で(電子:プロトン)=(2:3)、pH 2.9–pH 5.5で(電子:プロトン)=(1:1)、pH 5.5–pH 8.2で(電子:プロトン)=(2:1)、pH 8.2–pH 12で(電子:プロトン)=(1:1)であることがわかった。

pH依存性を見る限り、電極上フェノサフラニン薄膜は、2組のレドックスピーク対を有する。それぞれどのようなレドックス反応に相当するのかを、酸塩基反応と酸化還元反応の両方を考えて化学構造式で表したのがFig. 3.33である。Fig. 3.33の中のA⁻は対アニオンを表す。

溶存フェノサフラニン(O)では、
 pH 1.0–pH 4.3で(電子:プロトン)=(2:3), $\text{Ox}(\text{A}) \rightleftharpoons \text{Red}(\text{C})$
 pH 4.3–pH 6.6で(電子:プロトン)=(1:1), $\text{Ox}(\text{A}) \rightleftharpoons \text{Red}(\text{D})$
 pH 6.6–pH 12で(電子:プロトン)=(2:1), $\text{Ox}(\text{A}) \rightleftharpoons \text{Red}(\text{E})$
 と書けることがわかった。

一方、電極上フェノサフラニン薄膜(●)では、

pH 1.0–pH 2.9で(電子:プロトン)=(2:3), Ox(A) \rightleftharpoons Red(C)

pH 2.9–pH 5.5で(電子:プロトン)=(1:1), Ox(A) \rightleftharpoons Red(D)

pH 5.5–pH 8.2で(電子:プロトン)=(2:1), Ox(A) \rightleftharpoons Red(E)

pH 8.2–pH 12で(電子:プロトン)=(1:1), Ox(B) \rightleftharpoons Red(E)

と書けることがわかった。このように書き表されるだけではなく、SNIFTIRS測定により得られた差スペクトルの結果から、電解酸化による薄膜作製時に取り込まれた過塩素酸イオン(Fig. 3.33の中の A⁻, すなわち対アニオンに相当する)が還元過程で電荷中性の原理により薄膜から追い出されることが示唆された。その実験事実は、(電子:プロトン)=(2:1)の移動により、電荷的中性を保つために過塩素酸イオンが移動していることを示唆し、以上述べた機構で酸化還元反応が起こっていることの傍証となる。

フェナジンメトサルフェート(◆)では、pH 4–pH 9で(電子:プロトン)=(2:1)であることが報告されている[98]。フェノサフラニンの酸化還元反応は、pH7でフェナジンメトサルフェートと同じ(電子:プロトン)=(2:1)が関与する酸化還元反応であることがわかった。このことは、フェノサフラニンが、フェナジンメトサルフェートと同様、NADHの酸化のプロセスで放出される2電子1プロトンを通り過ぎて受け取ることができる電子移動メディエーターであることを意味する。このことが、「相性の良い」電子移動メディエーターの条件であると考えられる。溶存フェノサフラニンの場合と異なって、電極上フェノサフラニン薄膜の場合、中性付近で2つのレドックスピーク対が現れたが、この理由は明らかではない。電極上フェノサフラニン薄膜ではレドックスサイトのマイクロ環境が溶存フェノサフラニンのそれと異なるために、酸化体のpK_a[99]が観測されたと考えられる。

3.3.2.5 透明電極上でのフェノサフラニン色素薄膜の色の観察

溶存フェノサフラニンに比べてITO電極上フェノサフラニン薄膜では、極大吸収波長(λ_{\max})が長波長側へ(520 nm から542.5 nm へ)シフトすることがわかった(Fig. 3.34)。これは、電解作製したフェノサフラニン薄膜の場合、オリゴマーまたはポリマーの生成により π 電子共役が広がったためであると考えられる。第3.3.2.4節で観察したように、中点電位のpH依存性が溶存フェノサフラニンと異なることを考え合わせると、薄膜生成により薄膜内のレドックス活性サイトのマイクロ環境が変化していることが示唆された。

薄膜修飾電極では一般に溶存状態では実現できないような高いレドックス活性サイトの体積濃度になっている。たとえば電位掃引電解により生成したチオニン薄膜修飾電極の場合には、体積モル濃度が0.15 Mであった(第3.3.1.4

節)。このことが、溶存フェノサフラニンと電極上フェノサフラニン薄膜との極大吸収波長が異なる理由であると考えられる。

3.4 結論

アジン色素のアミノ基の電解酸化により、アジン色素修飾電極を作製することができた。フェノチアジン、フェノチアジンの3位と7位にアミノ基を持つチオニン、およびフェノチアジンの3位と7位にジメチルアミノ基を持つメチレンブルー、それぞれについて電解酸化を行ない、アミノ基の電解酸化により表面被覆量(Γ)が増大することを明らかにした。電位掃引電解により作製した修飾電極の電気化学的および分光学的性質は、色素を単に吸着させた電極のそれと異なることがわかった。例えば電極上フェノサフラニン薄膜においては、溶存フェノサフラニンとは異なり2組のレドックスピーク対が観察され、極大吸収波長が長波長側へシフトすることがわかった。また、フェノサフラニンのレドックス反応がpH 7では、(電子:プロトン)=(2:1)が関与する反応であることなどがわかった。

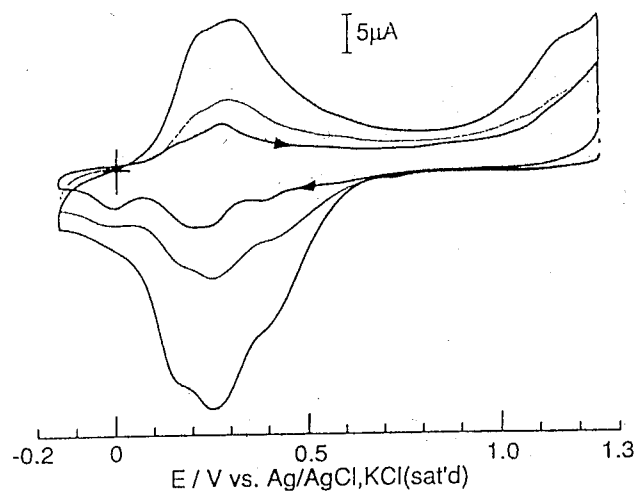


Fig. 3.1. Cyclic voltammograms of electrolysis of thionine at a bare BPG electrode (0.2 cm^2) in 0.1 M NaClO_4 aqueous solution (pH 1.0) containing $2.7 \times 10^2 \mu\text{M}$ thionine. Potential scan rate: 50 mV s^{-1} . Constant potential electrolysis was conducted at $+1.245 \text{ V}$ for 3, 10, and 10 min successively.

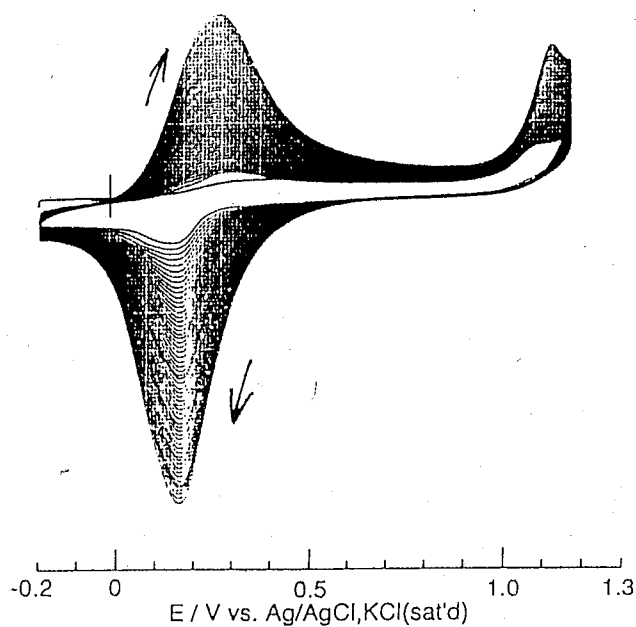


Fig. 3.2. Cyclic voltammograms of electrolysis of thionine at a bare ITO electrode (0.2 cm^2) in 0.1 M NaClO_4 aqueous solution (pH 1.0) containing $61 \mu\text{M}$ thionine. Potential scan rate: 50 mV s^{-1} . All scales are the same as those in Fig.3.1.

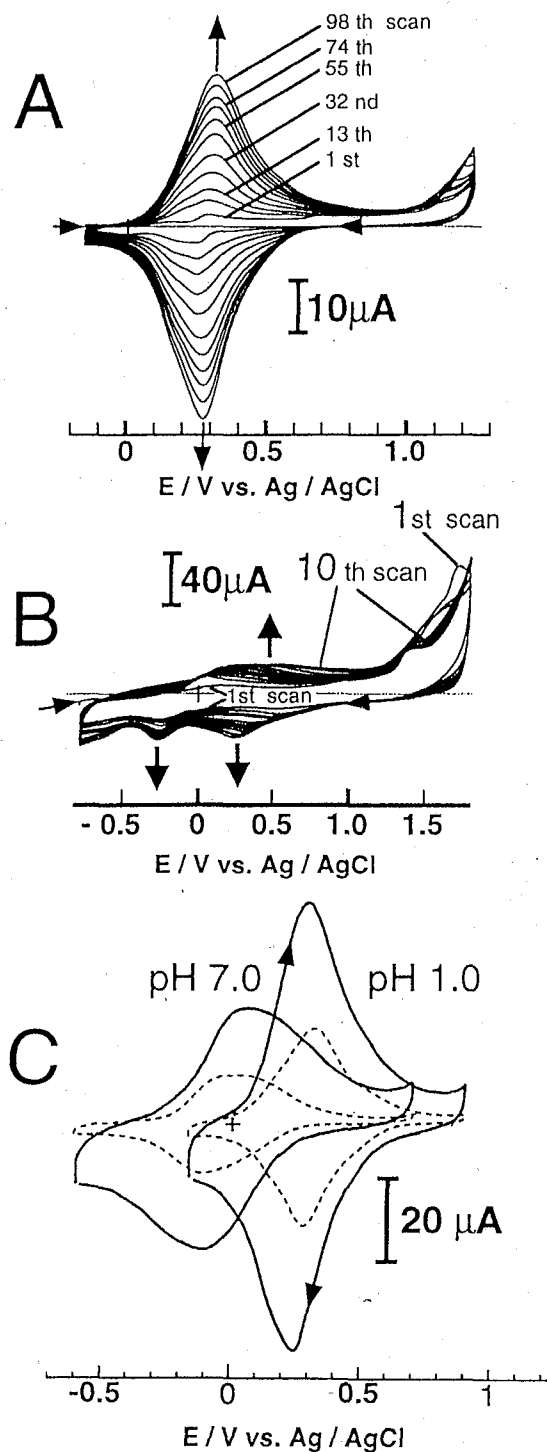


Fig. 3.3. (A,B) Cyclic voltammograms continuously recorded during the electrolysis of thionine at the BPG electrode (0.2 cm^2) in (A) 0.1 M NaClO_4 aqueous solution (pH 1.0) containing HClO_4 and $40 \mu\text{M}$ thionine and (B) 0.2 M NaClO_4 acetonitrile solution containing 1 mM thionine under an N_2 atmosphere. Potential scan rate: 50 mV s^{-1} . (C) Cyclic voltammograms representing the redox response of the thionine-modified electrodes in aqueous solutions of pH 1.0 ($0.1 \text{ M CF}_3\text{COONa} + \text{CF}_3\text{COOH}$) and pH 7.0 (0.2 M phosphate buffer). Potential scan rate: 50 mV s^{-1} . The thionine-modified electrodes were prepared as in A (\cdots) and B (—).

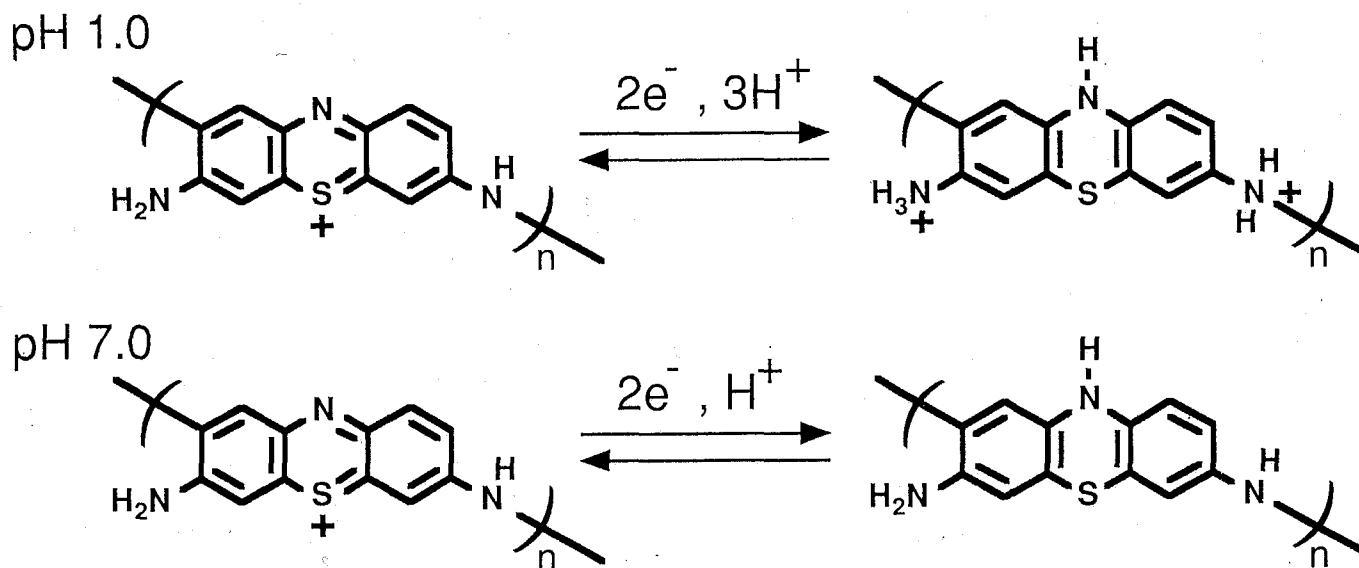


Fig. 3.4. Redox transformation of thionine - modified BPG electrodes in pH 1.0 and pH 7.0 aqueous solution.

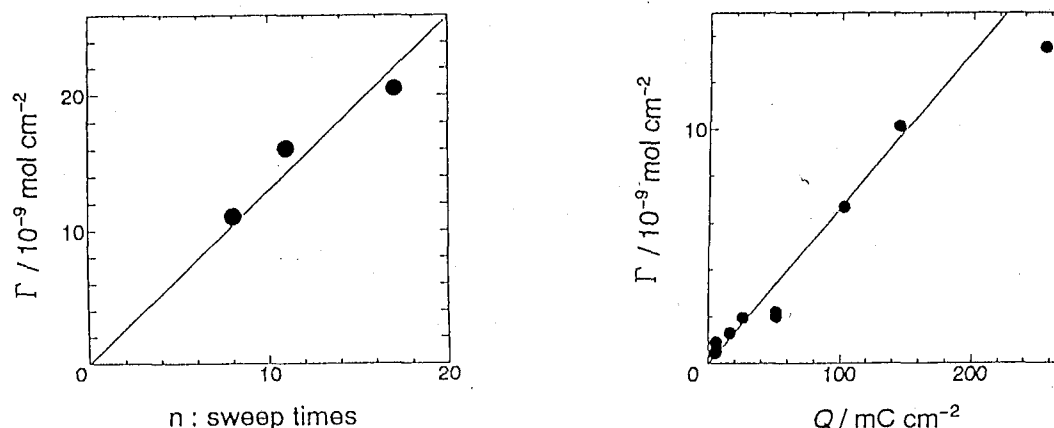


Fig. 3.5. Relationship between sweep times(n) for electrolysis of thionine and surface coverage (Γ) of thionine - modified BPG electrode. The potential - sweep electrolysis of thionine was conducted at 50 mV s^{-1} between -0.8 V and 1.8 V for n times in acetonitrile containing 1 mM thionine and 0.2 M NaClO_4 . The Γ values were estimated in units of mol cm^{-2} by measuring the area of cyclic voltammograms obtained at 5.0 mV s^{-1} in 0.2 M phosphate buffer solution(pH 7.0).

Fig. 3.6. Relationship between amount of charge passed (Q) during electrolysis of thionine and surface coverage(Γ) of thionine on BPG electrode. The constant - potential electrolysis of thionine was carried out at 1.8 V vs. $\text{Ag/AgCl, KCl(sat'd)}$ in acetonitrile containing 1 mM thionine and 0.2 M NaClO_4 .

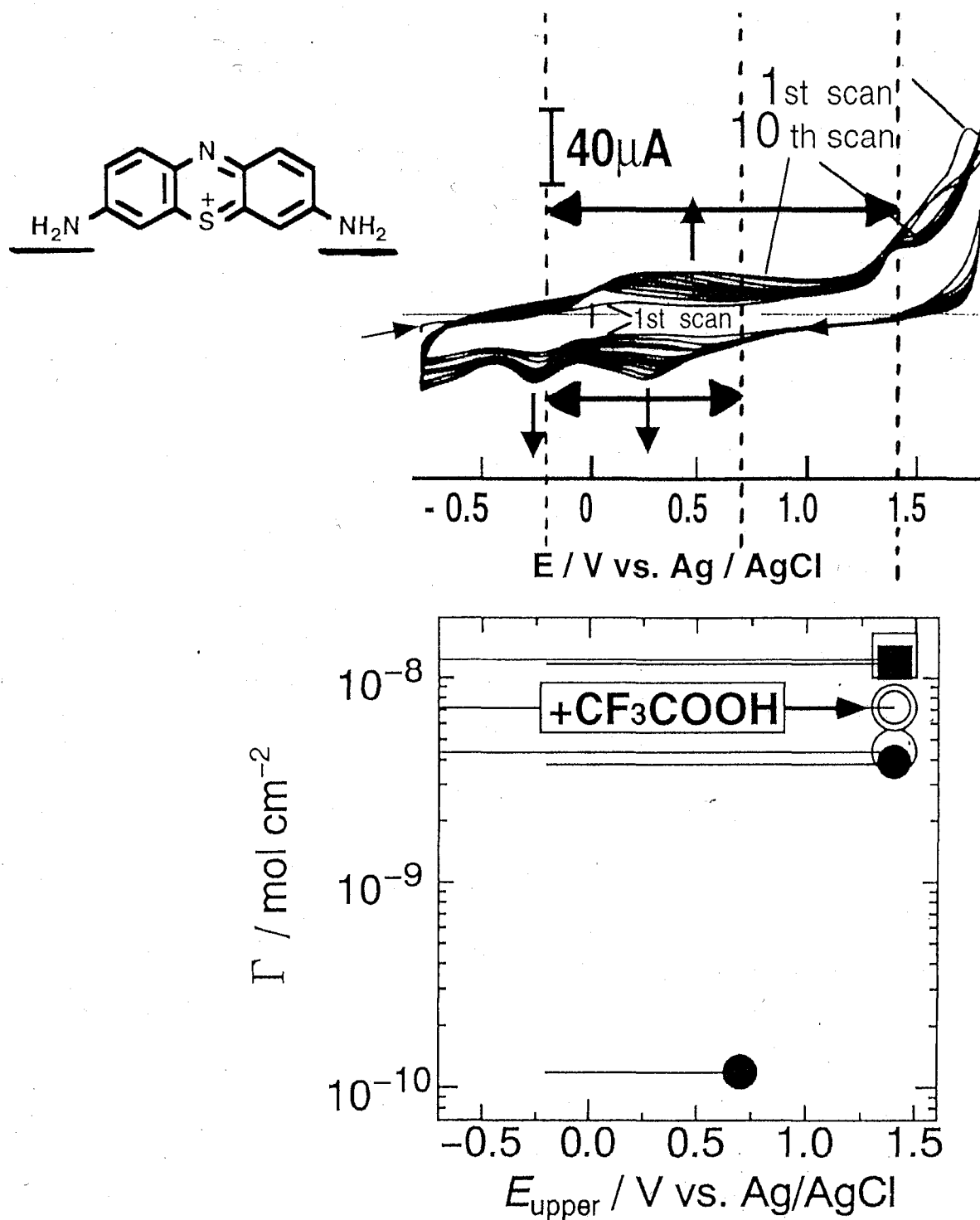


Fig. 3.7. Relationship between anodic upper - limit potential (E_{upper}) of electrolysis of thionine and surface coverage (Γ) of thionine on BPG electrode. The potential - sweep electrolysis of thionine was conducted at 50 mV s^{-1} in acetonitrile containing 10 mM thionine and 0.2 M NaClO_4 under the following conditions : starting potential and sweep times [●: -0.2 V , 10 times / ○: -0.8 V , 10 times / ⊙: -0.8 V , 10 times with $0.15 \text{ M CF}_3\text{COOH}$ / ■: -0.2 V , 50 min / □: -0.8 V , 50 min]. Γ was estimated by the same way as in Fig.3.5 (potential scan rate : 50 mV s^{-1}).

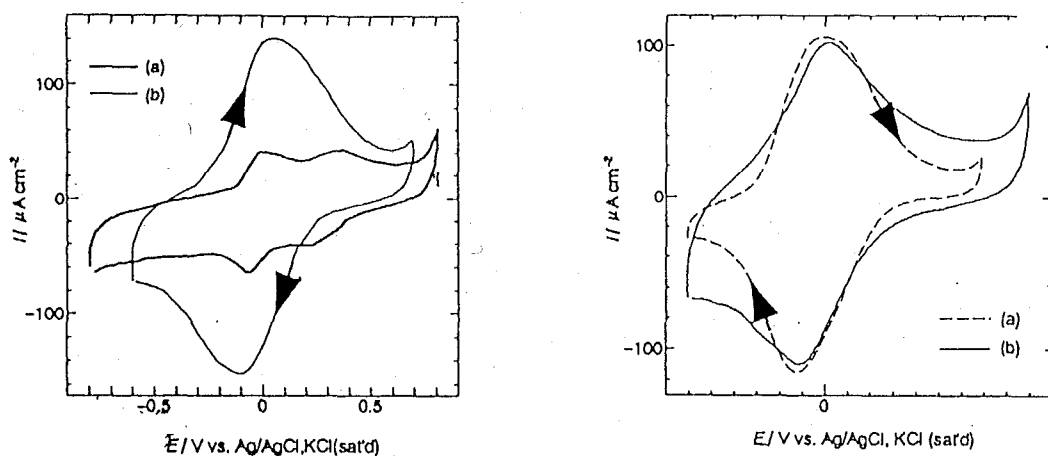


Fig. 3.8. Steady - state cyclic voltammograms of (a)phenothiazine adsorbed on BPG electrode and (b)thionine - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution(pH 7.0). Γ : (a) 5.4×10^{-10} mol cm^{-2} , (b) 5.4×10^{-9} mol cm^{-2} . Both electrodes were prepared by potential - sweep electrolysis(50 mV s^{-1}) in acetonitrile containing 0.2 M NaClO_4 and (a)10 mM phenothiazine, (b)1.0 mM thionine.

Fig. 3.9. Cyclic voltammograms of (a)thionine - modified BPG electrode and (b)modified BPG electrode prepared by depositing methylene blue in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution(pH 7.0). Γ : (a) 4.4×10^{-9} mol cm^{-2} , (b) 2.5×10^{-9} mol cm^{-2} . Potential scan rate : 50 mV s^{-1} .

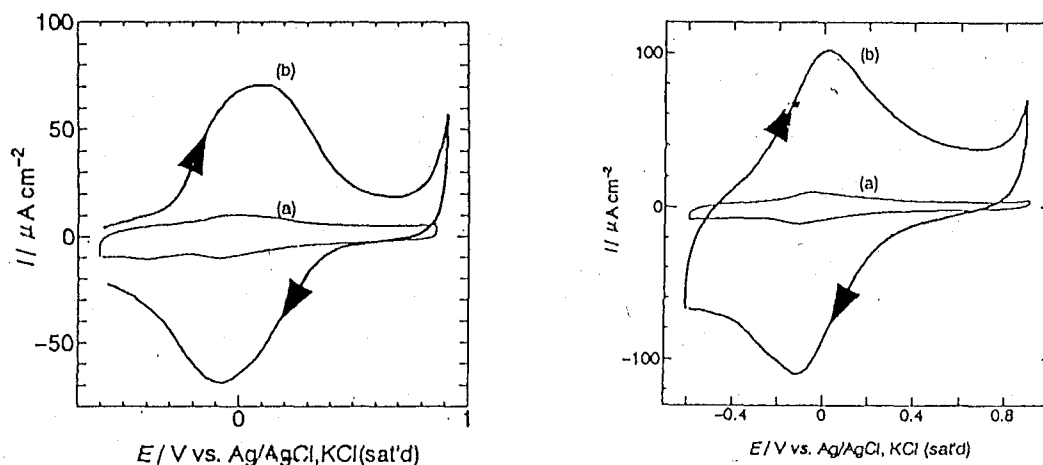


Fig. 3.10. Cyclic voltammograms of (a)thionine adsorbed on BPG electrode and (b)thionine - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution(pH 7.0). Γ : (a) 1.7×10^{-10} mol cm^{-2} , (b) 3.1×10^{-9} mol cm^{-2} . Potential scan rate : 50 mV s^{-1} .

Fig. 3.11. Cyclic voltammograms of (a)methylene blue adsorbed on BPG electrode and (b)methylene blue - modified BPG electrode prepared by depositing methylene blue in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution(pH 7.0). Γ : (a) 1.3×10^{-10} mol cm^{-2} , (b) 2.5×10^{-9} mol cm^{-2} . Potential scan rate : 50 mV s^{-1} .

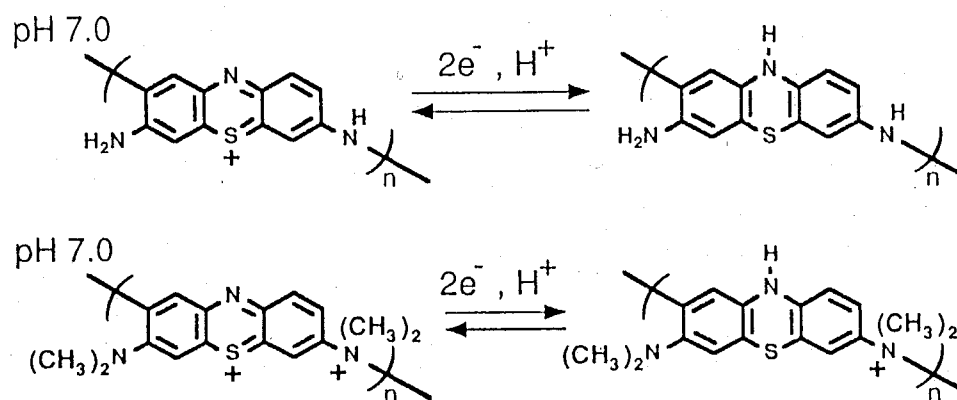


Fig. 3.12. Redox transformation of thionine - modified and methylene blue - modified BPG electrodes in pH 7.0 aqueous solution.

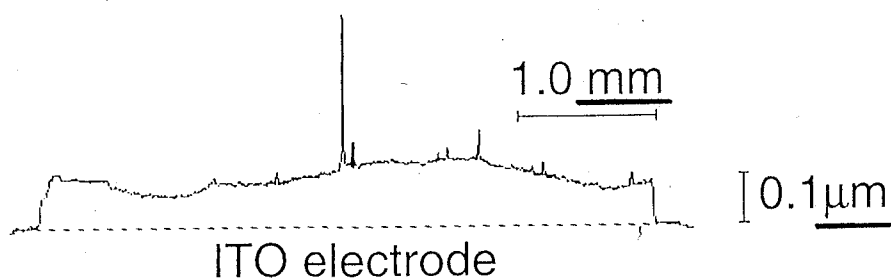


Fig. 3.13. A typical sectional profile of thionine film prepared on the ITO electrode. The thionine film was prepared on the ITO electrode (0.2 cm^2) by repeating potential scan 40 times at 50 mV s^{-1} between -0.8 and $1.8 \text{ V vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd)}$ in 0.2 M NaClO_4 acetonitrile solution containing 1 mM thionine. Electrical conductivity σ was measured for thionine - modified BPG electrode, $(0.37 \pm 0.04) \mu\text{m}$ thickness, using two probe method. $\sigma = (6.3 \pm 0.7) \times 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$.

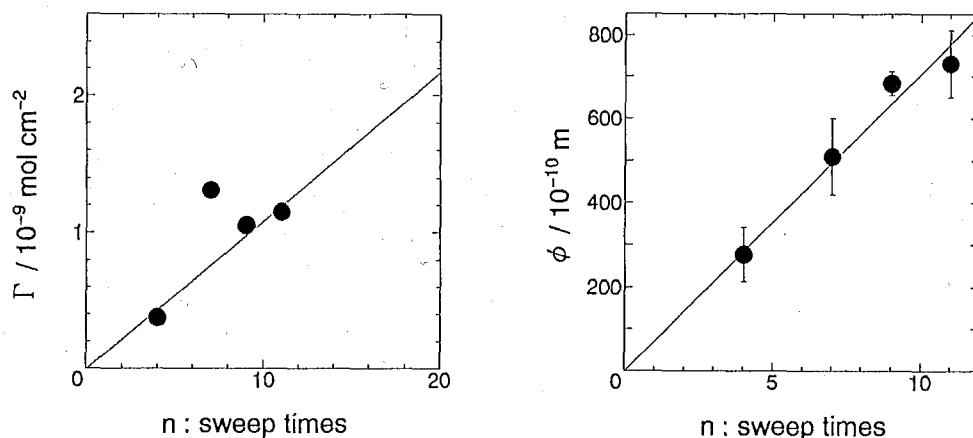


Fig. 3.14. Relationship between surface coverage(Γ) of thionine - modified ITO electrode and sweep times(n) for electrolysis of thionine. The potential - sweep electrolysis of thionine was conducted at 50 mV s^{-1} between -0.8 V and 1.8 V for n times in acetonitrile containing 1 mM thionine and 0.2 M NaClO_4 .

Fig. 3.15. Relationship between film thickness(ϕ) of thionine - modified ITO electrode and sweep times(n) for electrolysis of thionine. The potential - sweep electrolysis of thionine was conducted at 50 mV s^{-1} between -0.8 V and 1.8 V for n times in acetonitrile containing 1 mM thionine and 0.2 M NaClO_4 .

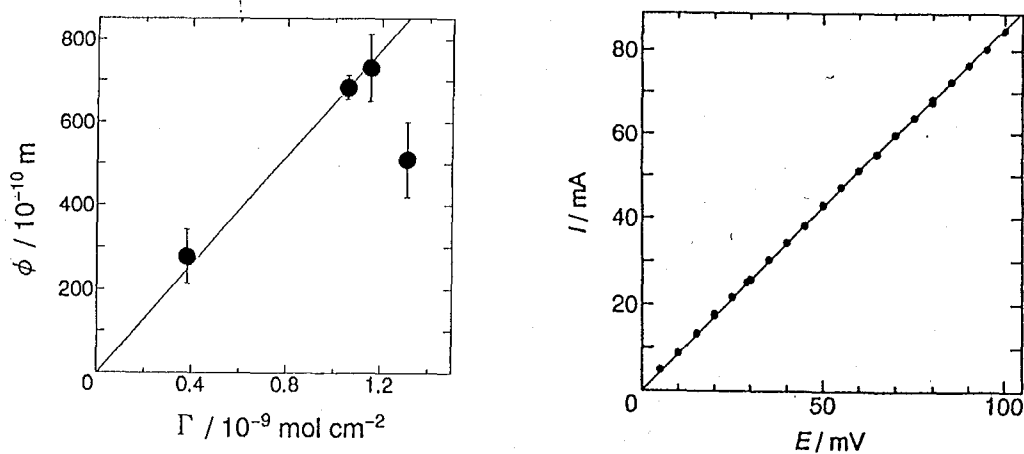


Fig. 3.16. Relationship between surface coverage(Γ) and film thickness(ϕ) of thionine - modified ITO electrode. The potential - sweep electrolysis of thionine was conducted at 50 mV s^{-1} between -0.8 V and 1.8 V in acetonitrile containing 1 mM thionine and 0.2 M NaClO_4 .

Fig. 3.17. Measurement of specific electric conductance of thionine on BPG electrode. Slope : 0.852 mA/mV . Film thickness: $(0.37 \pm 0.04) \mu\text{m}$. Electrode area : 0.05 cm^2 .

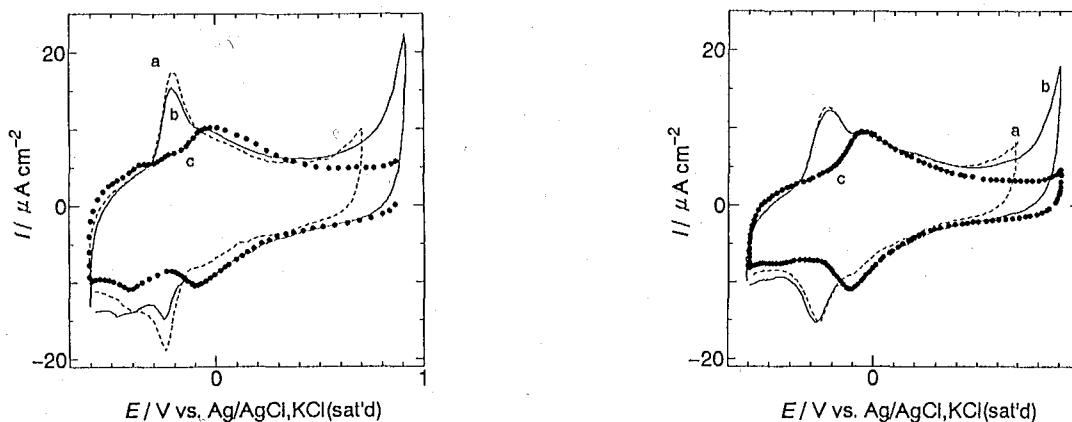


Fig. 3.18. Cyclic voltammograms of (a) thionine - adsorbed on BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) between -0.6 V and (a) $+0.7$ V, (b, c) $+0.9$ V *vs.* Ag/AgCl, KCl(sat'd) ; (a) the second voltammogram, (b) the second voltammogram, (c) voltammogram obtained after 90 min - potential cycling. Potential scan rate : 50 mV s^{-1} .

Fig. 3.19. Cyclic voltammograms of methylene blue adsorbed on BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) between -0.6 V and (a) $+0.7$ V, (b, c) $+0.9$ V *vs.* Ag/AgCl, KCl(sat'd) ; (a) the second voltammogram, (b) the second voltammogram, (c) voltammogram obtained after 90 min potential cycling. Potential scan rate : 50 mV s^{-1} .

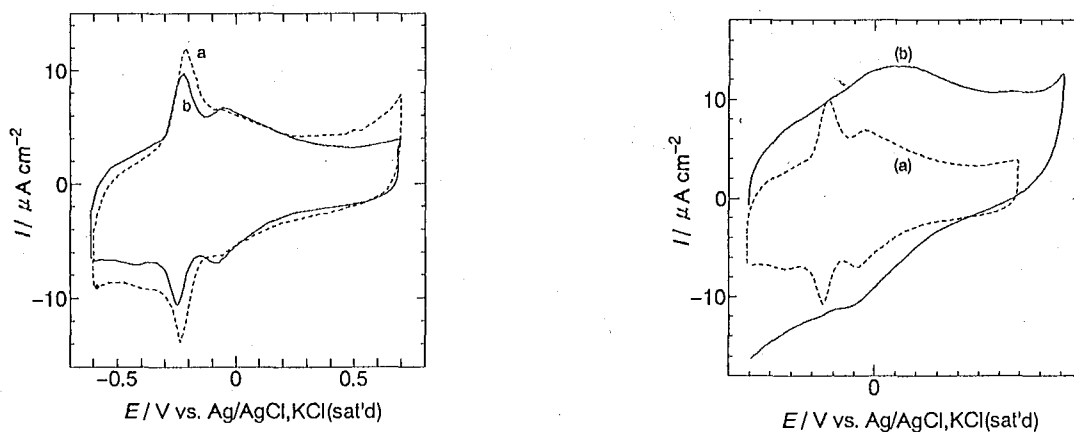


Fig. 3.20. Cyclic voltammograms of (a) thionine - adsorbed BPG electrode obtained after 90 min - potential cycling between -0.6 and $+0.7$ V *vs.* Ag/AgCl, KCl(sat'd), (b) thionine - modified BPG electrode obtained after 90 min - potential cycling. Potential scan rate : 50 mV s^{-1} .

Fig. 3.21. Cyclic voltammograms of (a) thionine - adsorbed BPG electrode obtained after 90 min - potential cycling between -0.6 and $+0.7$ V *vs.* Ag/AgCl, KCl(sat'd), (b) thionine - modified BPG electrode obtained after 90 min - potential cycling. Potential scan rate : 50 mV s^{-1} .

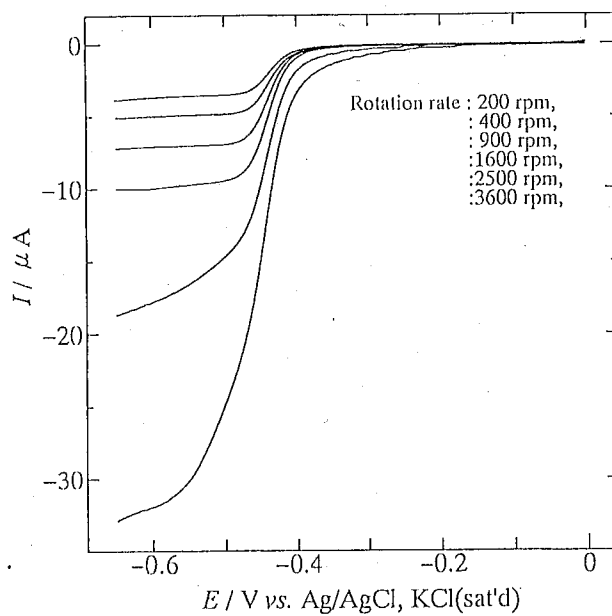


Fig. 3.22. Hydrodynamic voltammograms of 0.05 mM phenosafranine in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). Potential scan rate : 5.0 mV s^{-1} . Electrode rotation rate : 200, 400, 900, 1600, 2500, 3600 rpm.

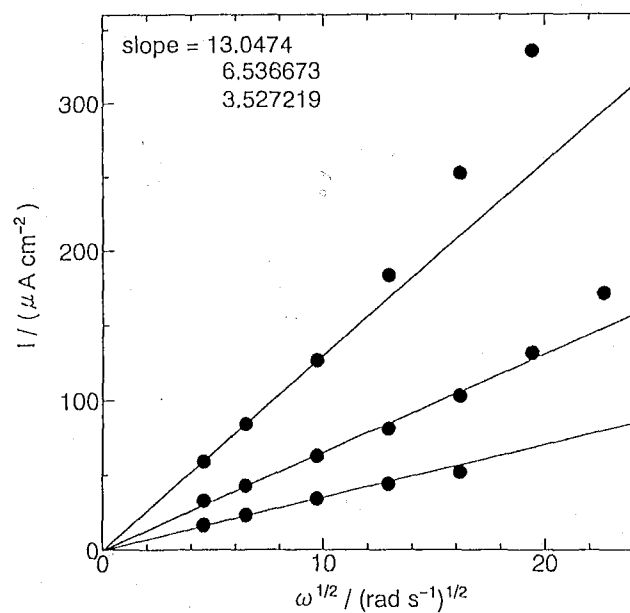


Fig. 3.23. Levich plots for reduction of 0.05, 0.1, and 0.2 mM phenosafranine at a bare BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

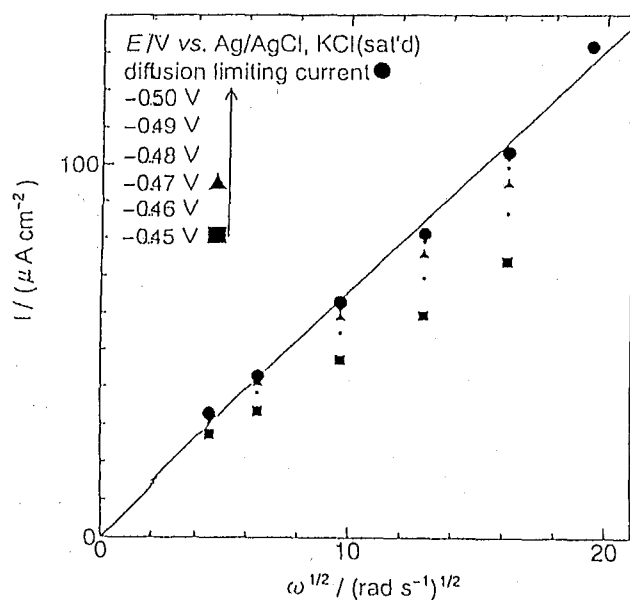


Fig. 3.24. i vs. $\omega^{1/2}$ of reduction of 0.1 mM phenosafranine at a bare BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

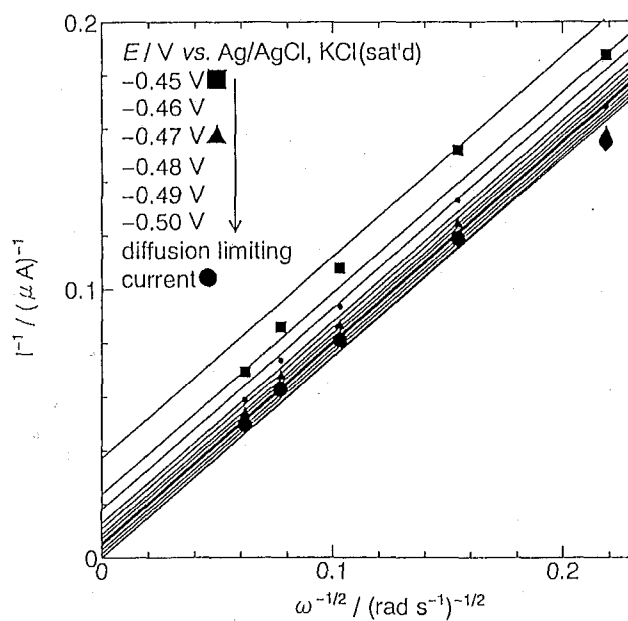


Fig. 3.25. i^{-1} vs. $\omega^{1/2}$ for reduction of 0.1 mM phenosafranine at a bare BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution. Data were taken from Fig.3.24.

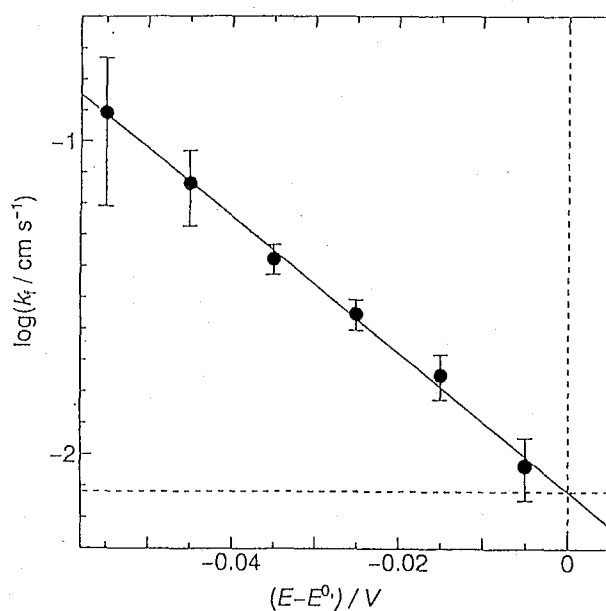


Fig. 3.26. A plot of $\log(k_f / \text{cm s}^{-1})$ vs. $((E - E^0) / \text{V})$. Data were taken from Fig 3.25.

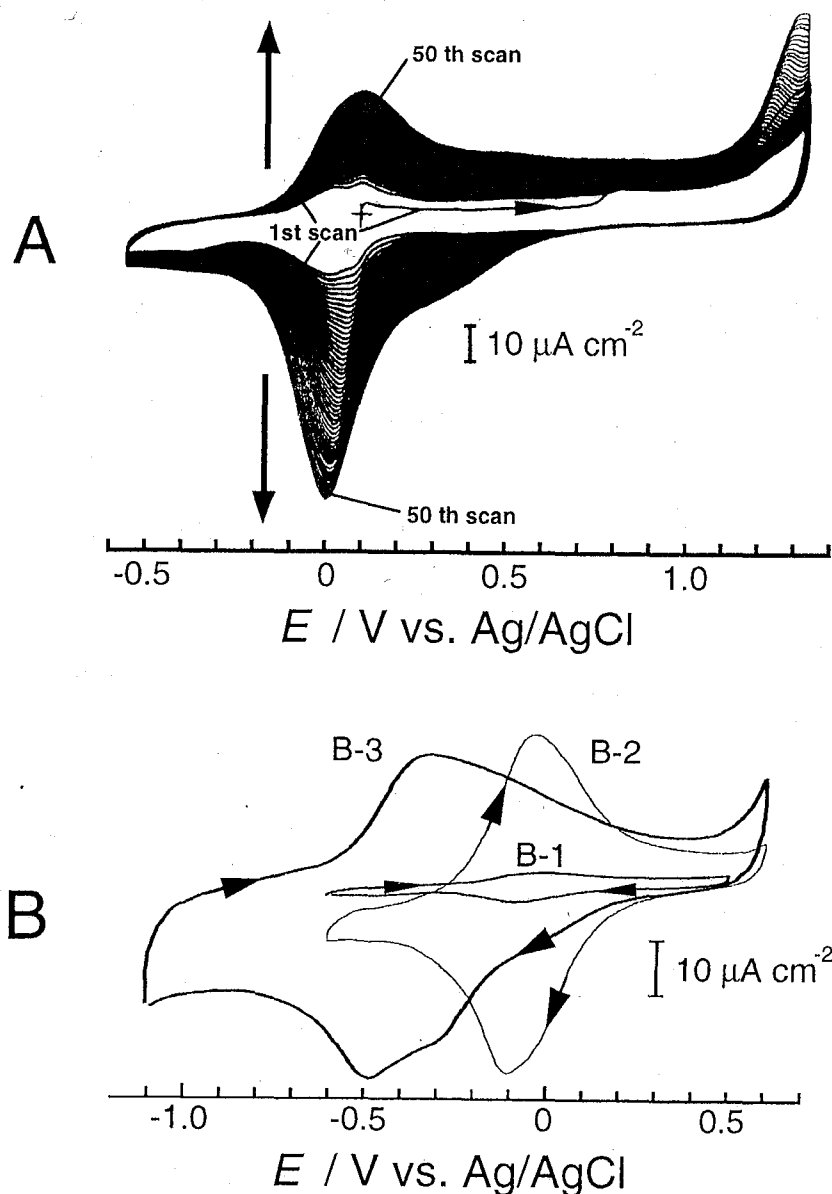


Fig. 3.27. (A) Cyclic voltammograms continuously recorded during the electrolysis of phenosafranine at a BPG electrode (0.2 cm^2) in an acidic aqueous solution (pH 1.0) containing NaClO_4 (0.1 M), HClO_4 and phenosafranine (1 mM) under an N_2 atmosphere. Potential scan rate: 50 mV s^{-1} . (B) Cyclic voltammograms of the phenosafranine - modified electrodes in NaClO_4 (1 M) solutions containing (B-1, 2) $\text{HCl} + \text{KCl}$ buffer (50 mM, pH 0.92) and (B-3) citric acid and phosphate buffer (50 mM, pH 7.0). Potential scan rate: 5 mV s^{-1} . The phenosafranine - modified electrodes were prepared (B-1) by repeating potential scan 50 times as in (A) and (B-2, 3) by repeating potential scan 10 times at 50 mV s^{-1} between -0.2 and $1.4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ in acetonitrile containing NaClO_4 (0.2 M) and phenosafranine (1 mM). Γ : (B-1) $4.6 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, (B-2) $7.7 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, (B-3) $9.4 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$.

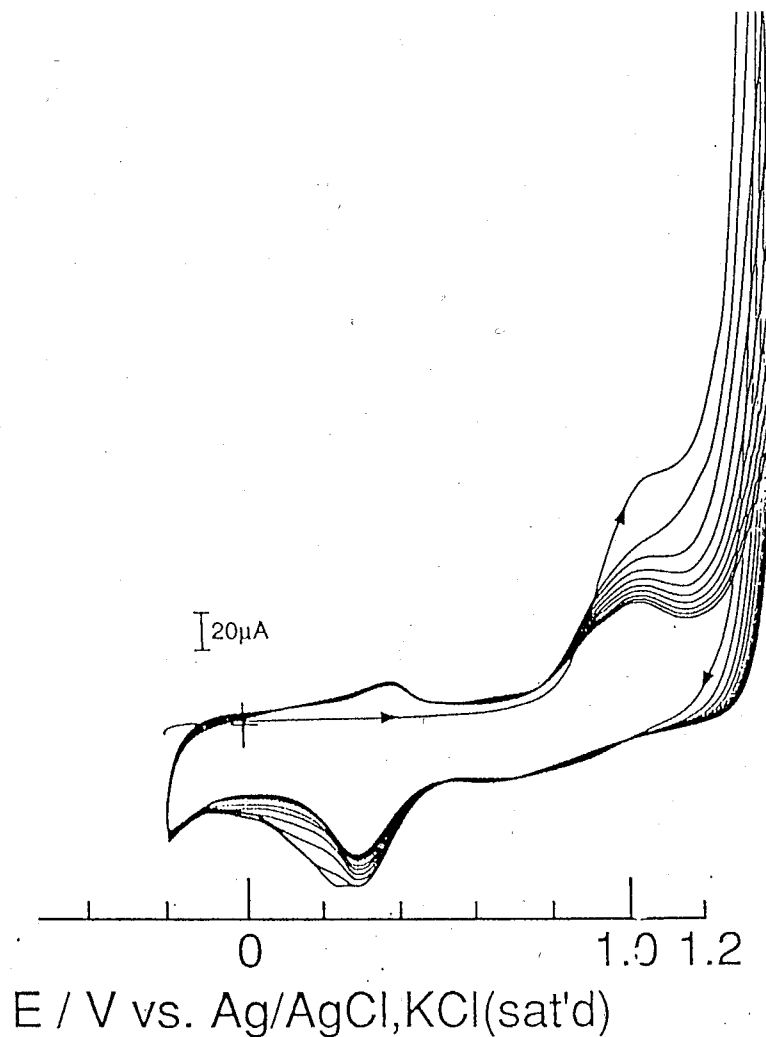


Fig. 3.28. Cyclic voltammograms of electrolysis of 10 mM phenosafranine at a bare BPG electrode (0.2 cm^2) in acetonitrile solution containing 0.2 M NaClO_4 .

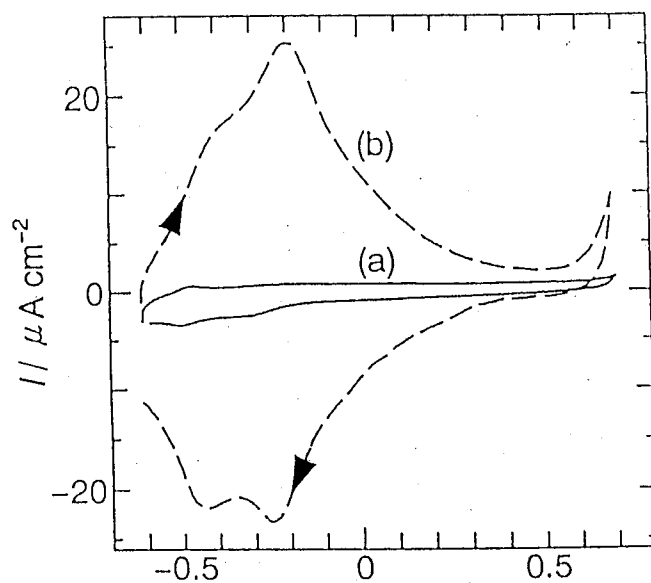


Fig. 3.29. Cyclic voltammograms of (a) phenosafranine - adsorbed and (b) phenosafranine - modified BPG electrodes in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

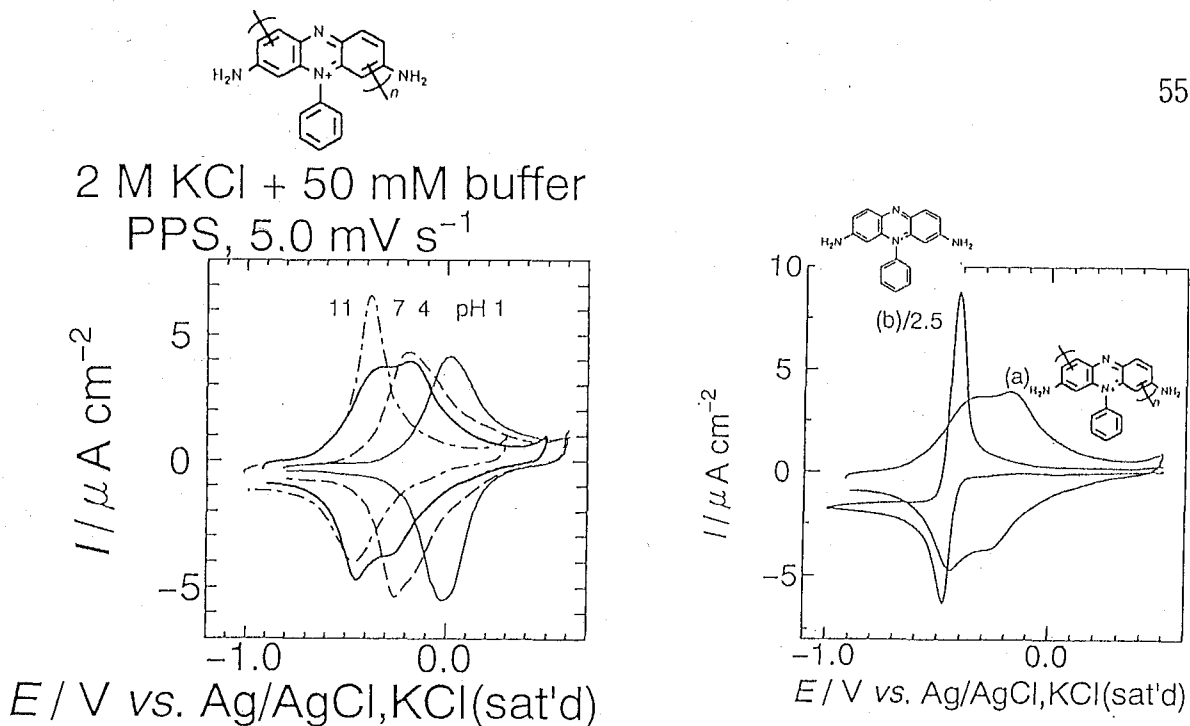


Fig. 3.30. Cyclic voltammograms of phenosafranine - modified BPG electrode in 2 M KCl + 50 mM buffer solution (pH 1, pH 4, pH 7 and pH 11, respectively).

Fig. 3.31. (a) Cyclic voltammogram of phenosafranine - modified BPG electrode in deaerated 2 M KCl + 50 mM aqueous buffer solution (pH 7.0). Potential scan rate : 5 mV s⁻¹. (b) Cyclic voltammogram of 1 mM phenosafranine at a bare BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). Potential scan rate : 5 mV s⁻¹.

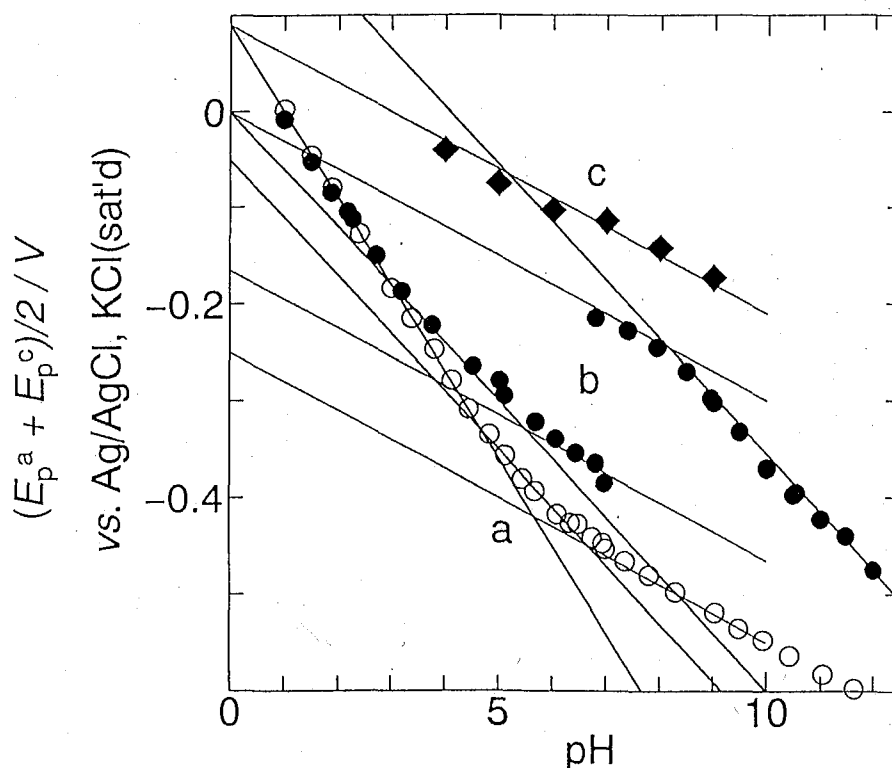


Fig. 3.32. Mean potentials of cyclic voltammograms of (a) 50 μM phenosafranine at a bare BPG electrode, (b) phenosafranine - modified BPG electrode as that in Fig. 3.30 in aqueous solutions containing 2 M KCl and 50 mM buffer. (c) Mean potentials of cyclic voltammograms of phenazine methosulfate at a Pt electrode (Kulys *et al.*)

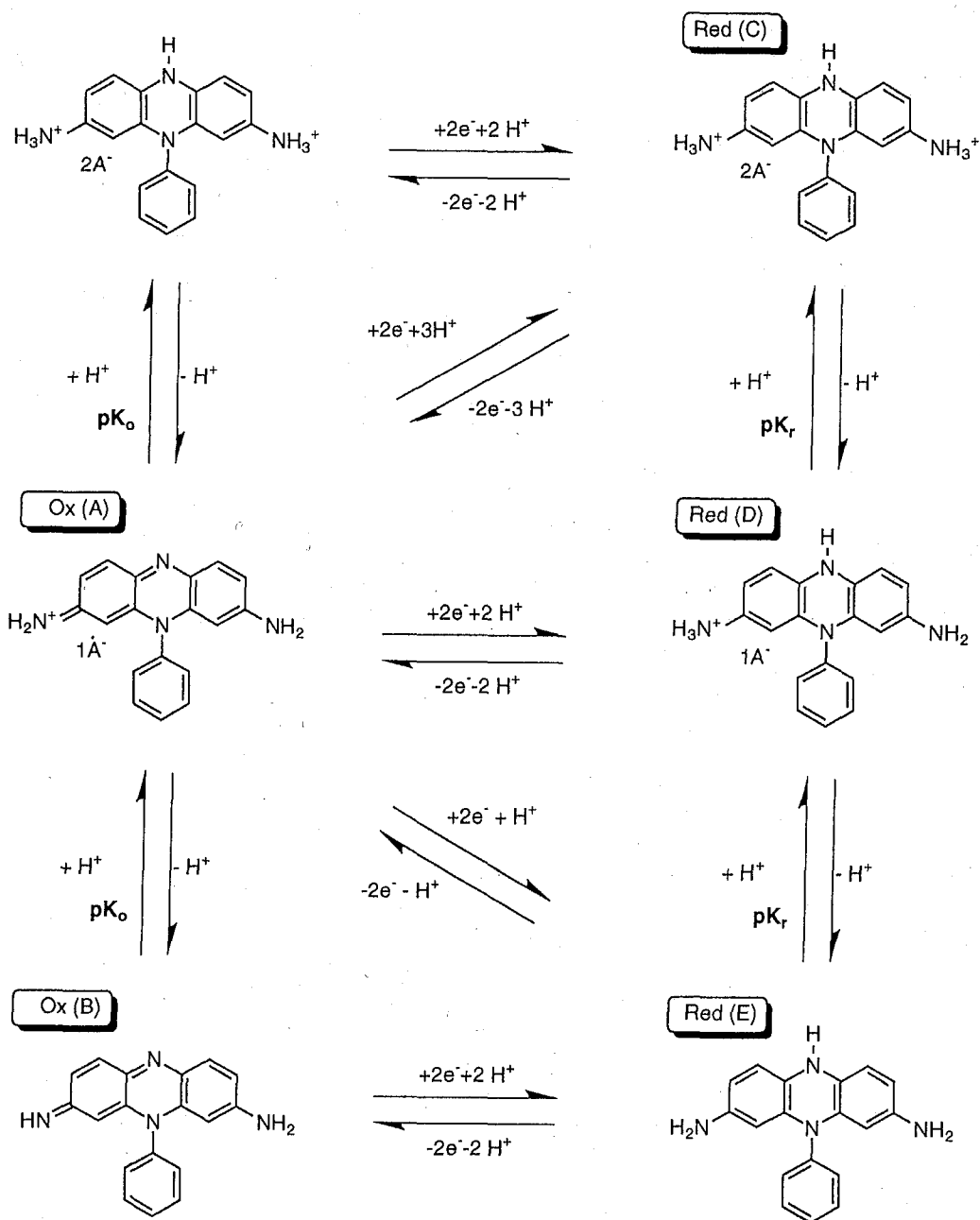


Fig. 3.33. Redox transformation of phenosafranine dye in various pH solution.

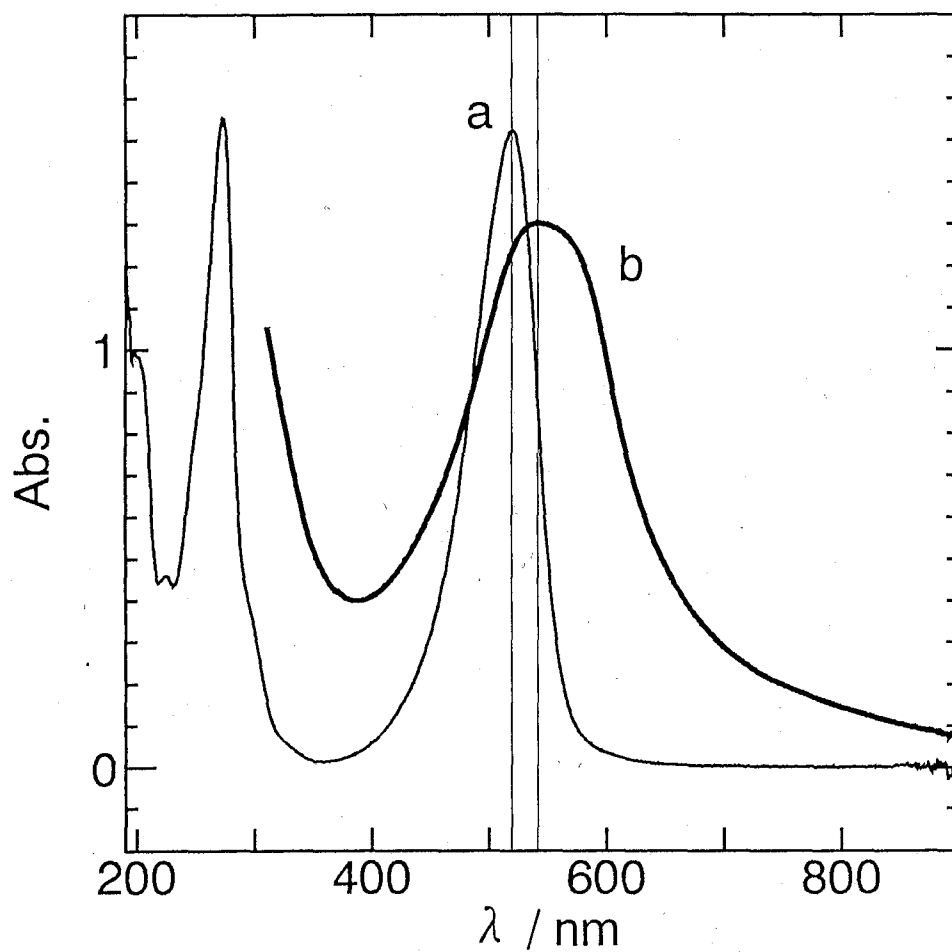


Fig. 3.34. UV - visible spectra of (a) 0.05 mM phenosafranine in aqueous solution and (b) phenosafranine - modified ITO electrode in 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). λ_{max} (a) : 520 nm, (b) : 542.5 nm.

第 4 章

アジン色素修飾電極による NADH の触媒酸化

4.1 緒言

第3章で述べたように、アミノ基の電解酸化によりアジン色素修飾電極を作製することができた。本章では、アジン色素の修飾電極を NADH 補酵素の電極触媒酸化に適用した結果について述べる。紫外可視分光法、サイクリックボルタンメトリーおよび回転円盤電極を用いる対流ボルタンメトリーにより、触媒反応機構の解析を行なった。触媒反応機構として、Gorton らが提唱している Michaelis-Menten 型の機構 [79] に従って系を解釈した。速度論的パラメーター (NADH の濃度をゼロに外挿した場合の見かけの 2 次反応速度定数: $k_{1([NADH]=0)}$ (単位, $M^{-1}s^{-1}$), 中間体を経由する反応機構から得られるミカエリス定数: $K_M(M)$, および中間体の解離反応の 1 次速度定数: $k_{+2}(s^{-1})$) を、チオニン、フェノサフラニン、およびフェノサフラニン誘導体それぞれについて評価し、反応機構の妥当性について考察した。

4.2 実験

4.2.1 試薬および実験装置

NADH(β -NADH(2Na 塩), オリエンタル酵母工業株式会社) は, そのまま用いた。支持塩 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (和光純薬工業株式会社), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (和光純薬工業株式会社) は, 特級試薬をそのまま用いた。チオニン (東京化成工業株式会社), フェノサフラニン (和光純薬工業株式会社, Aldrich Chem. Co.)

は、それぞれ特級試薬を第2章で述べたようにカラムクロマトグラフィーで精製したものを用いた。フェノサフラニン誘導体は、第2章で述べたとおり、市販品と合成したものとを用いた。水として、超純水を用いた。紫外可視吸収スペクトルの測定は、日立U-3300を用いた。吸収スペクトル測定用のセルとしては、光路長10 mmの石英セルを用いた。電気化学測定は、第2章で述べたのと同じ装置、および同じ電極、BPG(Basal-plane Pyrolytic Graphite)電極を用いた。基準電極は、第2章と同様Ag/AgCl, KCl(sat'd)を用いた。

4.2.2 アジン色素修飾電極の作製法

吸着法による単分子層レベルの修飾方法として、Gortonら[71]がフェノキサジン色素(1,2-ベンゾフェノキサジン-7-オン)をグラファイト電極上へ吸着させるときに用いたのと同様の方法を用いた。チオニンを例に挙げて説明する。電極をチオニン1 mM と 0.2 M NaClO₄ を含む脱気したアセトニトリル溶液に、電位をかけない状態で2分間浸漬した。この溶液中で1分間 900 rpm で電極を回転させた。チオニンが熱水に溶けることを利用して、2分間熱湯中に浸漬し強固に吸着していないチオニンを除いてから、超純水中で常温に戻した。続いて脱気した0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中で-0.6 V と+0.7 V の間を30分間電位掃引して安定化させた後に、次の測定を行なった。

電位掃引電解法による多分子層レベルの修飾方法として、チオニンを例に挙げて説明する。チオニン1 mM と 0.2 M NaClO₄ を含む脱気したアセトニトリル溶液中で電位掃引電解により修飾電極を作製した。-0.8 V から +1.8 V の電位範囲で、例えば2回の電位掃引電解を行なった。熱湯処理をして弱く吸着したモノマーを除去して、脱気した0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中で-0.6 V と+0.7 V の間を120分間電位掃引して安定化させた後に、次の測定を行なった。

4.2.3 測定系および測定方法

以上のように電位掃引電解法で作製したアジン色素修飾電極のサイクリックボルタモグラムを0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中で、NADH非存在下、存在下で測定することにより、薄膜修飾電極のみのレドックス応答およびNADHの触媒酸化を観測した。サイクリックボルタモグラムを測定したのと同じ組成の溶液で、回転円盤電極による対流ボルタンメトリーを行なうことにより、触媒反応の機構を解析した。

4.3 結果および考察

4.3.1 チオニン修飾電極

4.3.1.1 NADHの加水分解

NADHは、340 nmに極大吸収波長を持つ[100]が、酸化体NAD⁺にはこの吸収がない。一般に脱水素酵素反応によるNAD⁺の減少に伴うNADHの増加を監視するためには、この極大吸収波長における吸光度の変化を追跡することが行なわれている[101]。窒素雰囲気下0.1 mM NADHを含む0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中での吸光度の変化をFig. 4.1に示す。この挙動は、すでに知られているようにNADH自身の1,4-ジヒドロピリジン部位の加水分解[102]に起因する。しかしながら、この吸光度の減少は非常にゆっくりとしており、その半減期は、10数時間であった。したがって色素によるNADHの酸化反応に起因する吸光度変化と区別できるものと考えた。

4.3.1.2 チオニンによるNADH酸化の分光学的追跡

Fig. 4.2に、窒素雰囲気下0.05 mM チオニンを含む0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中でのチオニンの紫外可視吸収スペクトルを示す。このようにチオニンは599 nmに極大吸収波長を持つ。これは、 $\pi-\pi^*$ 遷移によるものであり、チオニンの酸化体に特有の吸収である。還元体にはこの吸収が無いため、還元体はleucothionineといわれている。これらの吸光度は、数時間の測定時間内で変化することはなかった。

0.05 mMのチオニンと0.10 mMのNADHが共存する0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中での340 nmでの吸光度変化を測定し、チオニンによるNADHの酸化反応の追跡をした際の吸光度の時間変化をFig. 4.3に示した。Fig. 4.4には、340 nm, 599 nmでの吸光度の時間変化を示した。340 nmでのNADHの吸収が減少することから、チオニンの酸化体によりNADHは確かに酸化されることがわかった。NADHが酵素活性があるNAD⁺となっていることは、チオニンを電子移動メディエーターとして、アルコールデヒドロゲナーゼ(アルコール脱水素酵素)を用いたアンペロメトリックバイオセンサーの研究で確かめられている[66]。

一方色素の酸化体の吸収(599 nm)は、最初急に増大して続いてゆっくり減少した。このことは、窒素ガスで30分以上脱気した後も抜けきれない微量の酸素によってチオニンの還元体が酸化される結果であると考えられる。このように分光測定を行なう場合には完全に脱酸素条件を用意する必要がある。

あるので、これ以上は行わなかった。そこで、次節に示すように電気化学法によってチオニンによるNADHの酸化反応速度定数を測定した。

4.3.1.3 チオニン修飾電極によるNADHの触媒酸化

サイクリックボルタンメトリーによる評価 紫外可視分光法により、チオニンの酸化体が確かにNADHを酸化することがわかった。そこで、電気化学的にNADHの触媒酸化を観測した。Fig. 4.5(c)は、未修飾BPG電極上での1 mM NADH酸化のサイクリックボルタモグラムである。第1章で述べたように、pH 7.0, 25°Cで NAD^+/NADH レドックス対の式量レドックス電位は -0.515 V である。Fig. 4.5(c)で観察されるように、酸化ピーク電位は約 $+0.6\text{ V}$ であり、 1 V 以上の過電圧をかけてはじめてNADHは電極上直接酸化されることがわかる。Fig. 4.5(a)は、多分子層レベル($\Gamma=3.5\times 10^{-9}\text{ mol cm}^{-2}$)のチオニン修飾電極自身のNADH非存在下でのサイクリックボルタモグラムである。Fig. 4.5(b)は、Fig. 4.5(a)のチオニン修飾電極を1 mM NADH存在下で得たサイクリックボルタモグラムである。

未修飾BPG電極上でのNADHの酸化Fig. 4.5(c)では、約 -0.1 V から約 $+0.4\text{ V}$ まで酸化電流が流れることはない。一方、Fig. 4.5(b)で約 $+0.3\text{ V}$ でピークを持つ電流は、電極で酸化されたチオニンがNADHと反応して還元体となり、そのチオニンの還元体がまた電極で酸化されることによって観測される酸化電流であり、NADHを触媒酸化する電流である。Fig. 4.5(b)における約 $+0.4\text{ V}$ から $+0.9\text{ V}$ までの電流は、触媒酸化電流と修飾電極を透過してNADHが直接酸化される電流とが複雑に混じり合って観測される電流である。このようにして電気化学的に、NADHの酸化を観測することができた。

溶存チオニンの式量レドックス電位は -0.25 V であり、一方チオニン多分子層修飾電極の式量レドックス電位は、約 0 V (Fig. 4.5(a))である。Fig. 4.5(b)に示されるように触媒電流は、式量レドックス電位よりも正の電位(ここでは、約 $+0.3\text{ V}$)の酸化ピーク電位を持っている。この酸化ピーク電位の正へのシフトは、式量レドックス電位よりもさらに電位をかけることにより、形成された中間体を酸化する、という中間体形成を経由した酸化反応を示唆する[103]。このような中間体の形成を考慮した反応機構の解析は、次項で説明する。

Fig. 4.6は、チオニンを単分子層レベルで吸着させた電極を用いてNADH触媒酸化能を観察した結果であるので、Fig. 4.5(b)とFig. 4.6(b)を比較することにより、触媒反応の電流が表面被覆量 Γ に依存することがわかる。Fig. 4.6(c)は、未修飾BPG電極上での1 mM NADHのボルタモグラムである。Fig. 4.6(a)は、単分子層レベル($\Gamma=1.4\times 10^{-10}\text{ mol cm}^{-2}$)のチオニン修飾電極自身のNADH

非存在下でのサイクリックボルタモグラムである。Fig. 4.6(b)は、Fig. 4.6(a)のチオニン修飾電極を1 mM NADH存在下で得たサイクリックボルタモグラムであり、Fig. 4.5(b)と同様にチオニン修飾電極によるNADHの触媒酸化を示すボルタモグラムである。Fig. 4.6(b)での触媒電流の大きさを比較すると、多分子層レベルでの触媒電流の半分以下であることがわかった。分子層の厚さと触媒反応の関係は、次項で詳細に述べる。Fig. 4.6(b)における約+0.4 Vから約+0.9 Vまでの電流は、触媒酸化電流と修飾電極を透過してNADHが直接酸化される電流とが複雑に混じり合って観測される電流である。

回転円盤電極を用いる対流ボルタンメトリーによる評価 サイクリックボルタモグラムの測定の後続いて、回転円盤電極装置を用いて電極を回転することにより対流ボルタモグラムを測定した。サイクリックボルタンメトリーで得られる情報が非定常状態での情報であるのに対して、対流ボルタンメトリーでは定常状態の情報が得られるので、解析が容易となる。

Fig. 4.5とFig. 4.6と同様に、触媒反応の電流が表面被覆量 Γ に依存することを示したのが、Fig. 4.7(b) ($\Gamma=0.9 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$)とFig. 4.8(b) ($\Gamma=6.3 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$)である。Fig. 4.7(c), Fig. 4.8(c)は、未修飾BPG電極上での1 mM NADHの200 rpm, 5 mV s^{-1} での対流ボルタモグラムである。Fig. 4.7(a), Fig. 4.8(a)は、チオニン修飾電極自身のNADH非存在下での対流ボルタモグラムである。Fig. 4.7(b), Fig. 4.8(b)は、それぞれ(a)のチオニン修飾電極を0.5 mM NADH存在下で得た対流ボルタモグラムである。Fig. 4.8(b)の方で、顕著であるが、+0.3 V~+0.5 Vの電位範囲で、電位に依存しない一定の電流が流れることが観測された。このように単純な拡散律速の定常電流や拡散と化学反応の両方が複雑に支配する定常電流を、電位に依存しない電流として得ることができるのが対流ボルタンメトリーの特徴である。サイクリックボルタンメトリーの結果と同様に、Fig. 4.7(b), Fig. 4.8(b)での触媒電流の大きさを比較すると、多分子層レベルでの触媒電流が、単分子層レベルでの触媒電流に比べて大きいことがわかる。以上の結果から、チオニンを多分子層レベルで電極上に集積することによりレドックス活性サイトの体積効果[104]が現れた結果、触媒電流の電流密度が増大することがわかった。

電位範囲を広げて対流ボルタモグラムを測定したのが、Fig. 4.9である。これらの測定では、900 rpmで電極を回転したまま50 mVごとに電位を保持してそれぞれの電位で2分間放置したのち電流を測定した。0.25 Vと0.9 Vでは、電位を保持した状態で電極の回転数を200, 400, 900, 1600, 2500, 3600, 4900 rpmと変えて、電流を測定した。Fig. 4.7(b), Fig. 4.8(b)での触媒電流と同様に、+0.2

～+0.5 Vでの多分子層レベルでの触媒電流は、単分子層レベルでの触媒電流に比べて大きいことがわかる Fig. 4.9(c,d)。Fig. 4.9(c,d)からわかることは、電位に依存しない一定の電流が2つの電位範囲で観測されることである。すなわち、+0.2～+0.5 Vの電位範囲と+0.8～+0.9 V(c), +1.0～+1.2 V(d)で電位に依存しない触媒反応律速の電流が観測された。以下では、+0.2～+0.5 Vの電位範囲の定常電流を(i_1)と表し第1波と呼び、+0.8～+0.9 V(c), +1.0～+1.2 V(d)の電位範囲の定常電流を(i_1+i_2)と表し第2波と呼ぶことにする。

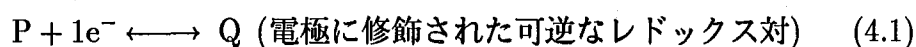
Fig. 4.10およびFig. 4.11は、(a)1.2, (b)3.89, (c)33.6, (d)55.7, 及び(e)70.9 $\times 10^{-10}$ mol cm⁻²の表面被覆量のチオニン修飾電極における1 mM NADHの触媒酸化の第1波(i_1)および第2波(i_1+i_2)の電流値をそれぞれ表面被覆量に対してプロットしたものである。これらから次のことが明らかである。

(1) 第1波の電流値は表面被覆量が 6×10^{-9} mol cm⁻²までは単調に増加し、 6×10^{-9} mol cm⁻²を越えると減少し始めた。

(2) 第2波の電流値は表面被覆量を増加すればするほど減少した。

この現象は、Andrieux, Savéantらにより理論的にも予測されていることである [105]。彼らの理論によれば分子層の厚さと触媒反応電流の大きさの関係を明快に説明することができるので、ここではAndrieux, Savéantら [105]の理論に基づいて説明する。

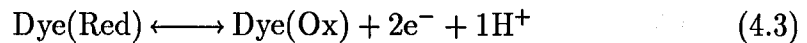
Andrieux, Savéantらは、薄膜修飾電極における『1段階非可逆的触媒反応に対する触媒反応機構』 [105]に関する論文で、次の様な反応式を前提にして機構の解析法を報告している。彼らは、1電子が関与する電子移動メディエーターの電気化学的に可逆な電極反応(式(4.1))に引き続いて起こる化学的に非可逆な触媒還元反応(式(4.2))に対して、



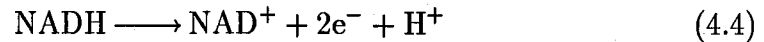
(A: 基質; κk : 式(4.2)の触媒反応速度定数)

一般式を理論的に導出した(Fig. 4.12, General Case)。その式は、式(4.1), (4.2)で示される単純な『1段階非可逆的触媒反応に対する触媒反応機構』に対する拡散方程式である。 i_1 , (i_1+i_2)は、先に述べた対流ボルタンメトリーで得た2つの電位範囲の定常電流(第1波 i_1)と(第2波(i_1+i_2))に相当する。

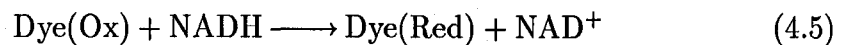
本研究で用いた電子移動メディエーター(チオニン及びフェノサフラニン)は、pH 7では、(電子:プロトン)=(2:1)の関与する電気化学的に可逆とみなせるレドックス対であるから、式(4.1)を次のように書きかえる。



NADHの酸化反応は第1章で述べたように電気化学的に非可逆な反応である。



NADHは酸化されて2電子, 1プロトン(H^+)を与えるので, NADHとDye(Ox)は, 電子, プロトンともに過不足なく反応することから, 次のように式をまとめることができる。



従って, 本研究の反応系でも, 式(4.1), 式(4.2)と同様な関係式を書くことができたので, Andrieux, Savéantらの理論式を使う前提を満たしているといえる。

ここで, Andrieux, Savéantらの理論の概要を述べることにする。高分子マトリックス中にレドックス活性サイトが存在する系を用いて基質の触媒酸化または触媒還元を行なう場合, 高分子薄膜被覆電極での電気化学的応答は, 未修飾電極の応答とは異なって, 次のような3つの過程を含む[106]。

(1) 電極と高分子膜内レドックス化学種との間の電子移動反応(いわゆる電極反応)

(2) 膜内での電荷および物質移動

(3) 溶液中でのレドックス化学種(基質)の物質移動,

触媒反応の律速段階を把握するには対流ボルタンメトリーが適しており, 特に回転円盤電極を用いた定常状態での電流-電位曲線の解析が, Savéantら[107][105][108], Murrayら[109][110]iked82, 小山・大坂ら[111][112]によって行なわれてきている。高分子修飾電極による溶存化学種の電極触媒反応機構の解明のための一般的モデルをFig. 4.13に示す。回転円盤電極を用いた定常状態での電流-電位曲線に対しては, Andrieux, Savéantらにより提案されているように, Fig. 4.13で示される4つの特性電流(i_E, i_k, i_S, i_A)の相対的な大小を評価することで触媒反応機構を把握することができる[105]。

i_f : ファラディック電流。通常の未修飾電極における不均一電子移動反応における Butler-Volmer 式がそのまま電極/膜界面でも成り立つ[113]。

i_S : 基質の膜中での物理的拡散過程を特徴づける電流。

i_k : 基質と膜内レドックス化学種との間の電子交換反応過程を特徴づける電流。

i_E : 膜中に固定されているレドックスサイト間での自己電子交換反応過程を特徴づける電流。

i_A : 基質の溶液相での物質移動を特徴づける電流。

高分子修飾電極系での正味の電流は一般に $i_{\text{net}} = f(i_f, i_E, i_k, i_S, i_A)$ で表され、定義式は次のとおりである。

$$i_f = i_0[\exp(-\alpha_- F\eta/RT) - \exp(\alpha_+ F\eta/RT)] \quad (4.6)$$

$$i_E = nFAC_{\text{Ox}}^0 D_E/\phi = nFA\Gamma_{\text{Ox}}^0 D_E/\phi^2 \quad (4.7)$$

$$i_k = nFAC_P^0 \kappa k_1 C_{\text{Ox}}^0 \phi = nFAC_P^0 \kappa k_1 \Gamma_{\text{Ox}}^0 \quad (4.8)$$

$$i_S = nFAC_P^0 \kappa D_S/\phi \quad (4.9)$$

$$i_A = nFAC_P^0 D_{\text{soln}}/\delta \quad (4.10)$$

ここで、それぞれの記号の説明をする。

i_0 : 交換電流。 $i_0 = nFAk_0(C_P^0)_+^\alpha (C_Q^0)_-^\alpha$

α_+, α_- : アノードイックおよびカソードイック移動係数

F : ファラデー定数 (96485 C mol⁻¹)

η : 過電圧 (V)

R : 気体定数 (8.3145 J K⁻¹ mol⁻¹)

A : 電極表面積 (cm²)

n : 反応電子数

P : 溶液相または溶液相から膜中へ拡散して来る基質の酸化体

Q : 溶液相または溶液相から膜中へ拡散して来る基質の還元体

C_P^0, C_Q^0 : 溶液中での P, Q のバルク濃度 (mol cm⁻³)

k^0 : 標準電極反応速度定数 (cm s⁻¹)

κ : P の溶液中と膜中での分配係数。 $\kappa = C_P^f/C_P^0$ (C_P^f は P の膜中での濃度)

D_S : 基質 P の膜中での拡散係数 (cm² s⁻¹)

D_E : 電子の膜中での見かけの拡散係数 (cm² s⁻¹)

D_{soln} : 基質 P の溶液中での拡散係数 (cm² s⁻¹)

ϕ : 電極表面上の高分子膜の厚さ (cm)

k_1 : 膜中固定レドックスサイトの還元体と基質 P との電子交換反応の速度定数 (cm³ mol⁻¹ s⁻¹)

C_{Ox}^0 : 膜中固定レドックスサイトの酸化体の濃度 (mol cm⁻³)

Γ : 膜中固定レドックスサイトの酸化体の膜中での表面濃度 (mol cm⁻²),

$\Gamma_{\text{Ox}}^0 = C_{\text{Ox}}^0 \phi$ が成り立つ。

δ : 対流ボルタンメントリーの場合の定常状態での拡散層の厚さ,

$\delta = 4.98 D_{\text{soln}}^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2} (\text{cm})$ が成り立つ。

ν : 動粘度 ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

ω : 電極の回転速度 (rpm)

対流ボルタモグラムの限界電流 (定常電流) が観察される電位範囲においては, i_f は十分大きいので, 反応を律速する電流とはならない。従って, 反応を特徴づける電流 (特性電流) は i_E, i_k, i_S , および i_A の4つである。これらの4つの特性電流のうち電極の回転数に依存するのは i_A のみである。

以上の理論式から, チオニン修飾電極による NADH の触媒酸化の第1波 (i_1) と第2波 ($i_1 + i_2$) を表面被覆量に対してプロットした図 (Fig. 4.10, Fig. 4.11) は, 以下のように説明できる。

第1波の電流値が表面被覆量を増大すればするほど増大する現象は, 定義式 4.8 ($i_k = nFA C_P \kappa k_1 C_{O_x} \phi$) より薄膜の厚さ ($\phi = \Gamma / C_{O_x}$) が増大するに比例して i_k が増大すること, すなわち i_k が全電流に対して支配的であると考えると説明できる。厚さが大きくなると i_1 の電流値が頭打ちになり減少を始めるのは, i_1 が i_k だけに支配されるわけではなく, 他の特性電流の複雑な関数になっていることを示している。また, 第2波の電流値が表面被覆量を増大すればするほど減少する現象は, 定義式 4.9 ($i_S = nFA C_P \kappa D_S / \phi$) より薄膜の厚さ ($\phi = \Gamma / C_{O_x}$) が増大するのに反比例して i_S が減少すること, すなわち i_S が全電流に対して支配的であると考えると説明できる。

回転円盤電極による対流ポルタンメトリーを用いた解析 薄膜の被覆量を単分子層レベル ($10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ のオーダー) にすると, ϕ (膜厚) が小さくなり, 定義式, 式 4.7, 式 4.9 より i_E, i_S が無限大となり, 律速とはならなくなるため, 限界電流に対する i_E と i_S (Fig. 4.13 参照) の寄与を無視できるため, 解析を簡単にすることができる。このように化学反応が全体の反応を律速するような条件下では, 回転電極により得られる触媒反応の定常電流 i_1 は次のように, i_A, i_k によって表される。

$$1/i_1 = 1/i_A + 1/i_k \quad (\text{Fig. 4-12(R-case)})$$

すなわち, Koutecky-Levich プロットにより, 全電流の逆数の値を電極の回転速度に依存する対流項 $1/i_A$ と電極の回転速度に依存しない化学反応の項 $1/i_k$ とに分離することができることから, Koutecky-Levich プロットの切片から i_k を評価できる。 i_k は化学反応に由来する電流であり定義式, 式 4.8 により, $i_k = nFA(C_P) \kappa k_1 \Gamma_{O_x}$ であるから, k_1 を算出できることになる。(ただし, 単分子レベルでは κ を定義できないので $\kappa = 1$ とおく。)

Fig. 4.14はチオニン色素の単分子レベル($\Gamma = 1.5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$)の修飾電極で得られた0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 及び 1.0 mMのNADHの触媒酸化の第1波の電流値のLevich plotである。Fig. 4.14のデータのKoutecky-Levich plotをFig. 4.15に示す。Fig. 4.15では、それぞれのNADH濃度において未修飾電極でのプロットの傾きに対して平行な直線を引き切片を求めることができる。すなわち、電極回転数を無限大に外挿して電極回転数に依存しない物理量(切片, i_k)を抽出することができる。切片の値を求め、定義式、式4.8により、 $i_k = nFA(C_P^0) \kappa k_1 \Gamma_{Ox}$ より、 $\kappa=1$ とおき、 k_1 を求めた。

k_1 のNADH濃度 C_{NADH} 依存性を調べた結果をFig. 4.16に示した。 C_{NADH} が増加すると、 k_1 は減少することがわかった。このような k_1 の C_{NADH} 依存性は、フェノキサジン修飾電極でGortonらも観測しており、以下のような前駆平衡を経る機構を仮定してその解釈に成功している。すなわちNADHと色素の酸化体(M_{Ox})が迅速平衡により、中間体[NADH M]を形成する(Fig. 4.17の(B)式)。その時の解離定数は K_S (Fig. 4.17の(C)式)である($K_S = [NADH][M_{Ox}]/[NADH M]$)。この中間体の中で電子移動が起こった後、解離して[NAD⁺]および[M_{Red}]を生成する。この式は形式的に、前駆平衡を考慮したMichaelis-Menten型の反応速度式[26]と同じである。Fig. 4.17の(D)式に示すように $K_M = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ とおいた。ここで、 k_{+1} は中間体の生成速度定数(2次反応速度定数)、 k_{-1} は中間体からもとの反応物に戻る1次反応速度定数、 k_{+2} は中間体から生成物ができるときの1次反応速度定数をそれぞれ表す。

このように考えれば、Fig. 4.17の(E)式で表されるような、Koutecky-Levich plotの切片から得られる k_1 は、Fig. 4.17(F),(G)式で表されるような関係がある。すなわち、 $1/k_1 = K_M/k_{+2} + C_{NADH}/k_{+2}$ と表されて、 $1/k_1$ を C_{NADH} に対してプロットすると、傾き K_M/k_{+2} 、切片 $1/k_{+2}$ をもつ直線関係が成り立つはずであることがわかる。

この機構は、サイクリックボルタンメトリーの項で説明したような、『チオニン修飾電極を用いたNADHの触媒酸化の酸化ピーク電位が、チオニン多分子層修飾電極でのチオニンの式量レドックス電位(Fig. 4.5(a)より約0 V)よりも正の電位(ここでは、約+0.3 V)にシフトしている』、という実験事実と矛盾しない。むしろ、この酸化ピーク電位の正電位側へのシフトは、式量レドックス電位よりもさらに電位を印加しなければ形成された中間体を酸化して生成物へと解離させることができないことを示唆する(Fig. 4.17の(A))ので、以上のような実験事実はFig. 4.17の(B)式のような反応中間体形成機構に包含することができる。そこでGortonらと同様な機構(Fig. 4.17の(B)式)を採用した。

Fig. 4.16の k_1 の逆数を C_{NADH} (NADH濃度)に対してプロットすると, Fig. 4.18に示すように実験誤差範囲内で直線関係を示し, (Fig. 4.17の(G)式)をみたすことがわかった。すなわち, 反応中間体形成機構(Fig. 4.17の(B)式)を考えれば実験事実を十分に説明できることがわかった。チオニン修飾電極については, $k_{+2} = 1.05 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 2.1 \times 10^{-4} \text{ M}$ であった。これらの速度論的パラメーターは, 第4.3.5節で, 他のアジン色素での結果と比較して考察する。

また, 酵素反応では, k_{+2}/K_M が酵素の特性値として議論されることがある。そこで, 同様に特性値として採用することにより, Gortonらは, $k_{+2}/K_M = k_{1([\text{NADH}] = 0)}$ と定義して, 他の修飾電極のNADH酸化触媒能を比較する場合に用いている。本研究でも同様にこの使い方をする。以下の節で他の修飾電極同士の反応速度定数を比較するときには, $k_{1([\text{NADH}] = 0)}$ を用いる。

Gortonらは以上のような解析を行なっているが, k_{+2} および K_M が色素やNADHの物理化学的な性質とどのような関係があるかについては特に議論していない。本研究では, 第5章で述べるように, 電子移動メディエーターによるNADH酸化反応の反応速度定数 k_1 , 速度論的パラメーター($k_{1([\text{NADH}] = 0)}$, k_{+2} および K_M)と「色素のLUMOのエネルギー準位, NADHのHOMOのエネルギー準位同士のエネルギー差」及び「色素のLUMO, NADHのHOMOの分子軌道同士の重なり積分」などとの関係について初めて考察した。

4.3.2 フェノサフラニン修飾電極

4.3.2.1 フェノサフラニンによるNADH酸化の分光学的追跡

Fig. 4.19に, 0.05 mM フェノサフラニンを含む窒素雰囲気下の0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中でのフェノサフラニンの紫外可視吸収スペクトルを示す。このようにフェノサフラニンは520 nmに極大吸収波長を持つ。これは, $\pi - \pi^*$ 遷移によるもので酸化体に特有の吸収であり, 還元体には吸収が無い。これらの吸光度は数時間の測定時間内で変化することはなかった。

Fig. 4.20に0.05 mMのフェノサフラニンと0.10 mMのNADHが共存する0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中での340 nmでの吸光度変化を測定し, フェノサフラニンによるNADHの酸化反応の追跡をした。Fig. 4.21には, 340 nm, 520 nmでの吸光度の時間変化を示した。340 nmでのNADHの吸収は減少したので, フェノサフラニンの酸化体により確かにNADHは酸化されることがわかった。フェノサフラニンによるNADHの酸化反応速度定数は, 電気化学法によって測定した。

4.3.2.2 フェノサフラニン修飾電極によるNADHの触媒酸化

サイクリックボルタンメトリーによる評価 紫外可視分光法により、フェノサフラニンの酸化体が確かにNADHを酸化することがわかった。そこで、電気化学的にNADHの触媒酸化を観測した。Fig. 4.22(c)は、未修飾BPG電極上での0.5 mM NADHのサイクリックボルタモグラムである。Fig. 4.22(a)は、多分子層レベル($\Gamma=1.1\times 10^{-8}$ mol cm⁻²)のフェノサフラニン修飾電極自身のNADH非存在下でのサイクリックボルタモグラムである。Fig. 4.22(b)は、Fig. 4.22(a)のフェノサフラニン修飾電極を0.5 mM NADH存在下で得たサイクリックボルタモグラムである。未修飾BPG電極上でのNADHの酸化(Fig. 4.22(c))では、約-0.2 Vから約+0.4 Vまで酸化電流が流れることはない。よって、Fig. 4.22(b)で約+0.1 Vでピークを持つ電流は、電極で酸化されたフェノサフラニンがNADHと反応して還元体となり、そのフェノサフラニンの還元体がまた電極で酸化されることによって、観測される酸化電流であり、NADHを触媒酸化する電流である。このようにして、電気化学的にNADHの触媒酸化を観測することができた。Fig. 4.22(b)における約+0.4 Vから+0.7 Vまでの電流は、触媒酸化電流と修飾電極を透過して直接酸化される電流とが複雑に混じり合って観測される電流である。

溶存フェノサフラニンの式量レドックス電位は-0.46 Vであり、一方フェノサフラニン多分子層修飾電極の式量レドックス電位はFig. 4.22(a)より約-0.45 V、-0.25 Vである。より正の電位(ここでは、約+0.1 V)で触媒酸化電流がピークを持っている。この酸化ピーク電位の正電位へのシフトは、式量レドックス電位よりもさらに電位をかけて、形成された中間体を酸化して、生成物へと解離させなければならないため中間体形成を示唆する[103]。このような中間体の形成を考慮した反応機構の解析は、次項で説明する。Fig. 4.23には、フローインジェクション分析によって、NADHがどのような電位から酸化されるかを示した。フェノサフラニンのレドックス電位は-0.46 Vなので、-0.4 Vという低い電位でNADHを酸化する事ができた。フローインジェクションの詳細な結果については、第6章で述べる。

回転円盤電極を用いる対流ボルタンメトリーによる評価 NADHの触媒酸化の対流ボルタモグラムを測定したのが、Fig. 4.24である。この測定では、900 rpmで電極を回転したまま50 mVごとに電位を保持してそれぞれの電位で2分間放置したのち電流を測定した。0.3 Vでは、電位を保持した状態で電極の回転数を200, 400, 900, 1600, 2500, 3600, 4900 rpmと変えて、電流を測定した。+0.2 ~ +0.4 Vにおいて電位に依存しない定常電流が観測された。Fig. 4.25はフェ

ノサフラニン色素の単分子レベル($\Gamma=2.7\times 10^{-10}$ mol cm⁻²)の修飾電極による0.1, 0.2, 0.35, 0.5, 0.7, 1.0 mMのNADHの触媒酸化の第1波の電流値のKoutecky–Levich plotの切片からチオニン修飾電極と同様の機構を仮定して求めた k_1 を, NADH濃度(C_{NADH})に対してプロットしたものである。Fig. 4.25に示すように, k_1 は, C_{NADH} の増大につれて減少することがわかった。この挙動はチオニン修飾電極と同様であった。Fig. 4.26に示すようにプロットして、4本の電極の平均をとることにより得た k_{+2} , K_M は,

$$k_{+2} = (6.35 \pm 1.58) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}, \quad K_M = (2.0 \pm 0.29) \times 10^{-4} \text{ M}$$

であった。これらの速度論的パラメーターは、第4.3.5節で他の色素での結果と比較して考察する。

4.3.3 フェノサフラニン誘導体修飾電極

フェノサフラニン誘導体についても同様に5 mV s⁻¹のサイクリックボルタモグラムおよび対流ボルタモグラムを測定し、それらをFig. 4.27~4.61に載せた。各色素について、チオニン及びフェノサフラニンと同様に解析して得られた速度論的パラメーターをTable. 4.1にまとめて示した。

Table 4.1. Kinetic parameters for catalytic oxidation of NADH at electrodes modified with phenosafranine derivatives.

dye	k_{+2}/s^{-1}	K_M/M	Figures
<i>p</i> -methyl-phenosafranine	$(2.30 \pm 0.70) \times 10^{-2}$	$(1.10 \pm 0.31) \times 10^{-4}$	4.27–4.30
<i>p</i> -methoxy-phenosafranine	$(3.34 \pm 1.07) \times 10^{-2}$	$(2.83 \pm 0.66) \times 10^{-4}$	4.31–4.34
<i>p</i> -isopropyl-phenosafranine	$(4.45 \pm 0.24) \times 10^{-2}$	$(2.60 \pm 1.05) \times 10^{-4}$	4.35–4.38
<i>p</i> -nitro-phenosafranine	$(8.45 \pm 0.26) \times 10^{-2}$	$(1.50 \pm 0.22) \times 10^{-4}$	4.39–4.42
safranine O	$(4.91 \pm 0.59) \times 10^{-2}$	$(1.15 \pm 0.25) \times 10^{-4}$	4.43–4.46
methylene violet 3RAX	$(1.32 \pm 0.16) \times 10^{-1}$	$(5.66 \pm 1.37) \times 10^{-4}$	4.47–4.49
indoine blue	$(8.24 \pm 2.01) \times 10^{-2}$	$(1.04 \pm 0.33) \times 10^{-4}$	4.50–4.53
phenazine methosulfate	$(8.91 \pm 1.58) \times 10^{-1}$	$(4.01 \pm 1.59) \times 10^{-4}$	4.54 - 4.57
phenazine ethosulfate	$(4.42 \pm 0.43) \times 10^{-1}$	$(1.46 \pm 0.49) \times 10^{-4}$	4.58 - 4.61

4.3.4 中間体形成モデルの妥当性

前節まで、色素によるNADHの触媒酸化反応を中間体が反応途中に存在するような機構を考へて解析を行なった。この機構は以下の理由から妥当であると考えた。Gortonらは、電極に修飾したフェノキサジン色素であるNile Blue AとNADHが形成する電荷移動錯体の検出をSERS(表面増強ラマンスペクトル)と電気化学測定との*in situ*測定[103]により行なっている。フェノサフラニン(アルキルフェナジニウム構造)とNile Blue A(フェノキサジン構造)はどちらもアジン色素であり、構造が類似している。ゆえに、Nile Blue Aと同様にフェノサフラニンもNADHと電荷移動錯体を形成すると考えるのは妥当である。また、福住ら[28]は、*p*-キノンである

-クロラニル(chloroanil)(テトラクロロ-*p*-ベンゾキノン)がNADH類縁体であるN-Benzylnicotinamide(BzNH)と電荷移動錯体を形成することを報告している。筆者はフェノサフラニンとNADH類縁体(BzNH)の電荷移動錯体の形成を期待して溶媒をアセトニトリルとしてストップフロー・ラピッドスキャン紫外可視分光法でその形成反応を追跡した。福住らの系は再現することができたけれども、フェノサフラニンとBzNHの系では電荷移動錯体によるフェノサフラニンおよびBzNH以外の明瞭な第3の吸収ピークを観察できなかった。おそらくフェノサフラニンとBzNHによる電荷移動錯体のモル吸光係数が小さいことが理由であると考えられる。Gortonらが電荷移動錯体を観察できたのは、SERSが積算して信号を得る感度の高い測定法であるためであると考えた。

以上のように、本研究の系では中間体の一つの可能性である電荷移動錯体の存在を確証する実験事実を得られなかったが、中間体を形成する機構を仮定すれば現象を説明できたので、現在の所この中間体モデルは妥当であると考えた。

4.3.5 速度論的パラメーター($k_{1([NADH]=0)}$, k_{+2} および K_M)の解釈

$\log k_{1([NADH]=0)}$ を式量レドックス電位(E°)に対してプロットしたのが、Fig. 4.62である。傾向として、 E° が増大するにつれて、NADH濃度をゼロに外挿して得た2次反応速度定数 $k_{1([NADH]=0)}$ が増大することがわかる。

一般に、反応速度定数 k の対数は、反応の活性化自由エネルギー変化 ΔG^{\ddagger} に比例する[114]。すなわち、 $\ln k \propto \Delta G^{\ddagger}$ 。

ポラーニ-エヴァンス則(Polanyi-Evans rule)[115][1]という化学反応の活性化エネルギーに対する経験則によれば、「似たような一連の化学反応においては、

活性化エネルギーの変化は、反応前後のエンタルピー変化におよそ比例する、ということが知られている。すなわち、 $\Delta(\Delta G^\ddagger) \propto \Delta(\Delta H)$ 。エントロピー変化が2つの反応で一定という $\Delta(\Delta S) = 0$ とみなせるような条件では、反応前後のエンタルピー変化は反応前後の自由エネルギー変化におよそ比例する。すなわち、 $\Delta(\Delta H) \propto \Delta(\Delta G)$ (なぜならば $\Delta(\Delta S) = 0$)。また、式量レドックス電位が異なるフェノサフラニン誘導体がNADHと反応する場合の反応前後の自由エネルギー変化の差は、 $\Delta(\Delta G) \propto \Delta E^o$ である。よって、 $\Delta(\Delta H) \propto \Delta E^o$ が成り立つ。

以上より、Fig. 4.62の $\Delta(\ln k) \propto \Delta E^o$ という現象は、 $\Delta(\Delta G^\ddagger) \propto \Delta(\Delta G)$ を表し、一連のフェノサフラニン誘導体によるNADH酸化反応の反応速度定数の傾向は、線形自由エネルギー関係(linear free energy 関係)とみなせることがわかった。

Fig. 4.63は、 $\log(k_{+2})$ および $\log(K_M)$ の式量レドックス電位に対するプロットを示す。Gortonらのメルドーラブルー [116] と1,2-ベンゾフェノキサジン-7-オン [71] に対する結果もプロットした。 $\log(k_{+2})$ の値は、式量レドックス電位が増大するにつれて、増大する傾向がある。他方、 $\log K_M$ の値は、フェノサフラニン誘導体でほぼ同じオーダーであるとみなすことができる。迅速平衡が成り立つ条件、すなわち $k_{+1}, k_{-1} \gg k_{+2}$ であれば、 K_M は、中間体の解離定数 K_S とほぼ同じであるとみなすことができる。すなわち、 K_M が一定であるとは、 K_S が一定であり、色素とNADHが中間体を形成する傾向がアジン色素系列でほぼ同じとみなすことができる。Fig. 4.64はNADHの触媒酸化の素過程を模式的に表したものである。3段階に分け、それぞれ次のとおりである。

(A) 中間体の形成段階,

(B) 中間体内での電子移動過程,

(C) 中間体の開裂,

K_M は、中間体の解離定数 K_S とほぼ同じであるとみなすことができ、Fig. 4.64(A)の段階を支配すると考えられる。 k_{+2} は、電子移動して生成物へと解離する Fig. 4.64(B),(C) の段階を支配すると考えられる。

このような素過程を経ながら、Fig. 4.64(A),(B),(C) を全て反映して、全体の反応速度定数である2次反応速度定数 $k_{1([NADH]=0)}$ が、観測されると考えられる。 $k_{1([NADH]=0)}$, $\log k_{+2}$, $\log K_M$ と色素のLUMO(最低空分子軌道)のエネルギー準位との関係を第5章でさらに考察した。

4.4 結論

アジン色素修飾電極により NADH の触媒酸化が可能であることを見出し、その挙動を分光学的及び電気化学的に明らかにした。回転円盤電極を用いた対流ボルタンメトリーにより NADH 触媒酸化反応機構を解析したところ、アジン色素による NADH の触媒酸化反応は、Gorton らが提唱した Michaelis-Menten 型の触媒反応機構 [79] すなわち、反応中間体が生成することを考慮することによって説明できることがわかった。 $\log K_M$ が溶存色素の式量レドックス電位 $E^{\circ'}$ に依存しないことから、中間体の生成しやすさはアジン色素でほぼ同じであることを見出した。中間体生成後の電子移動反応速度の対数 $\log k_{+2}$ と溶存色素の式量レドックス電位 $E^{\circ'}$ とは正の相関関係があることを見出した。

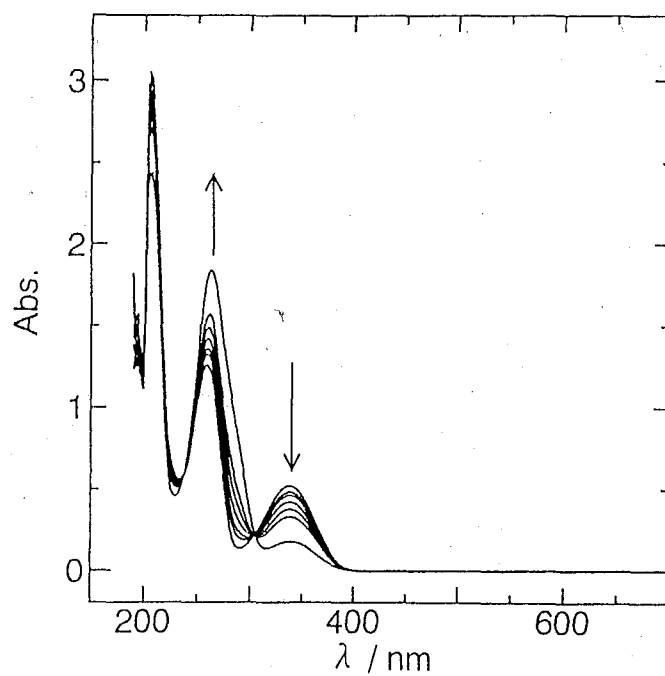


Fig. 4.1. UV - visible spectra of 0.1 mM NADH in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7). Spectra were obtained at 0, 29, 126, 179, 251, 355, 488 and 1263 min, respectively.

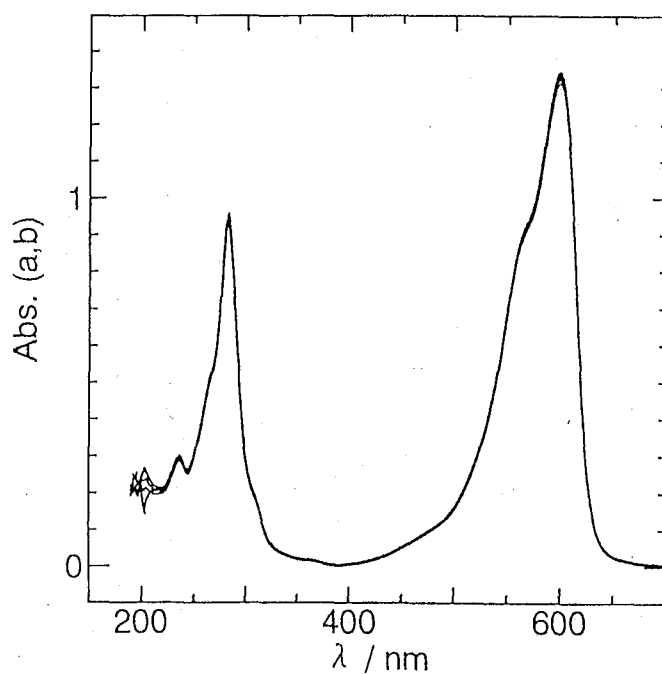


Fig. 4.2. UV - visible spectra of 0.05 mM thionine in deaerated 0.2 M phosphate buffer (pH 7). Spectra were obtained at 0, 151, 614 and 1365 min, respectively.

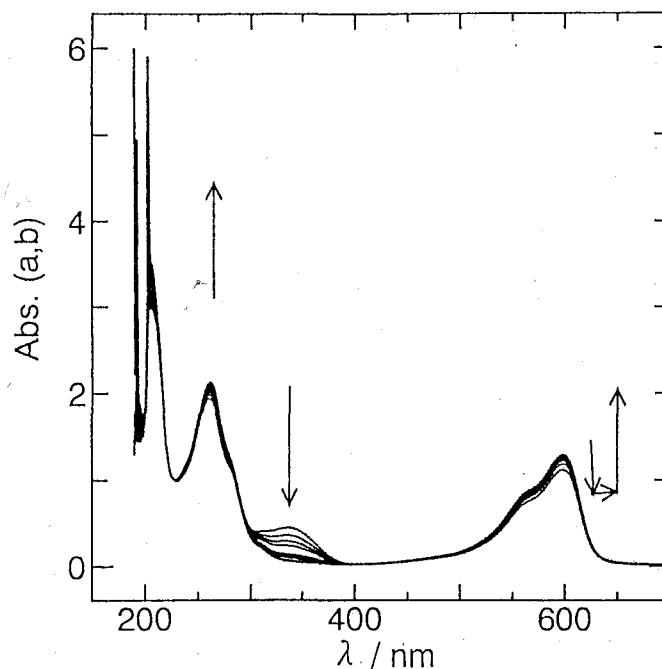


Fig. 4.3. UV - visible spectra of 0.05 mM thionine + 0.1 mM NADH in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7). Spectra were obtained at 5, 8, 12, 15, 23, 27, 31, 61, 102, 186, 282, 415 and 1203 min, respectively.

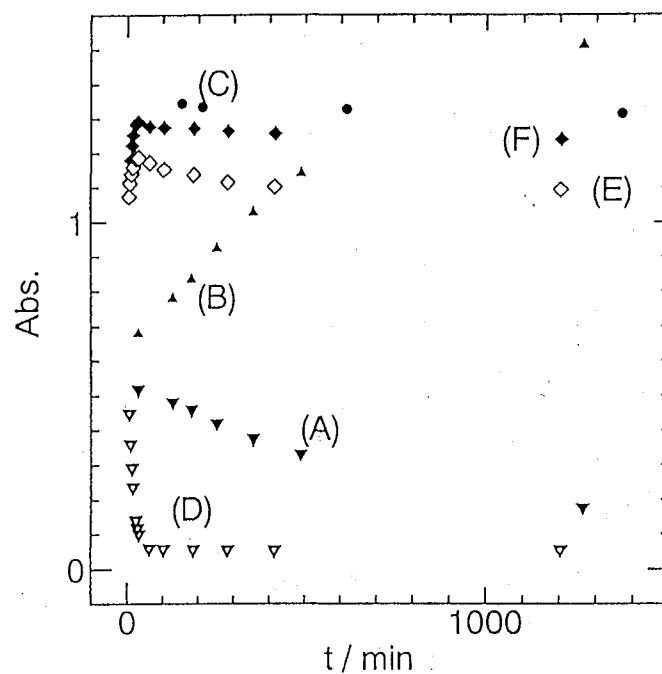


Fig. 4.4. Relationship between time and absorbance for oxidation of 0.1 mM NADH by 0.05 mM thionine in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7). (A) 340 nm of NADH solution (hydrolysis, see Fig.4.1); (B) 273 nm of NADH solution (hydrolysis, see Fig.4.1); (C) 599 nm of NADH solution (see Fig.4.2); (D) 340 nm of (NADH + thionine) solution; (E) 283 nm of (NADH + thionine) solution; (F) 599 nm of (NADH + thionine) solution. Data were obtained from Fig.4.3.

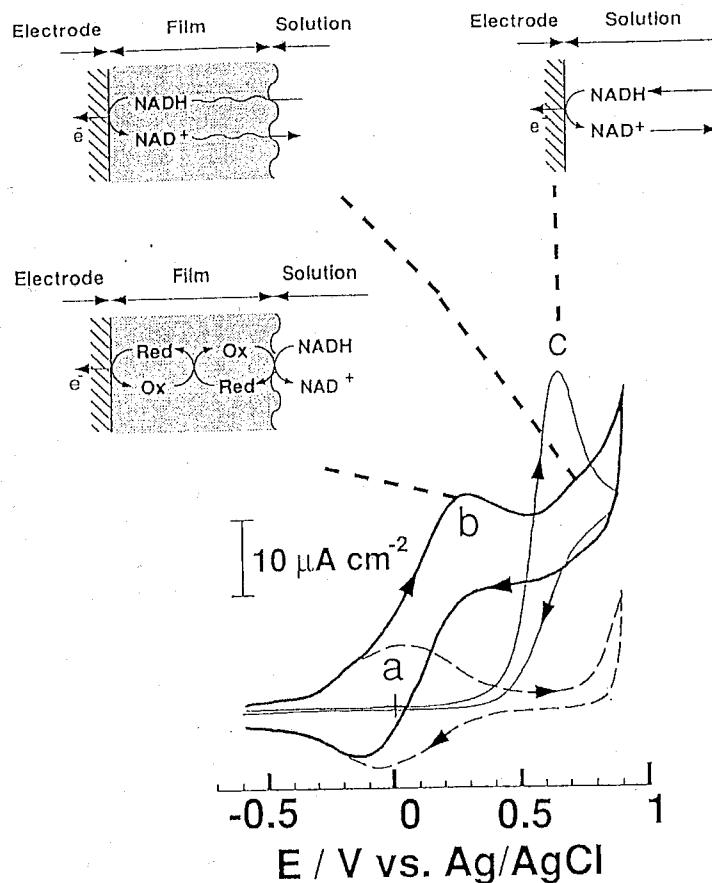


Fig. 4.5. Cyclic voltammograms of (a,b) thionine - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 6.9) in the absence (a) and in the presence (b) of 1 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode. Surface coverage (Γ): (a,b) 3.5×10^{-9} mol cm $^{-2}$.

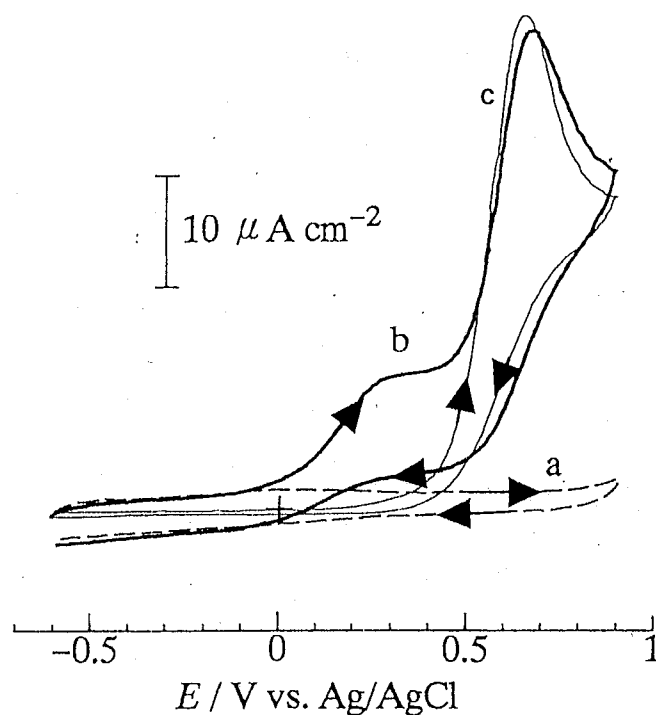


Fig. 4.6. Cyclic voltammograms of (a - b) thionine - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solutions (pH 6.9) in the absence (a) and in the presence (b) of 1 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode. Surface coverage (Γ): (a,b) 1.4×10^{-10} mol cm $^{-2}$. Potential scan rate : 5.0 mV s $^{-1}$.

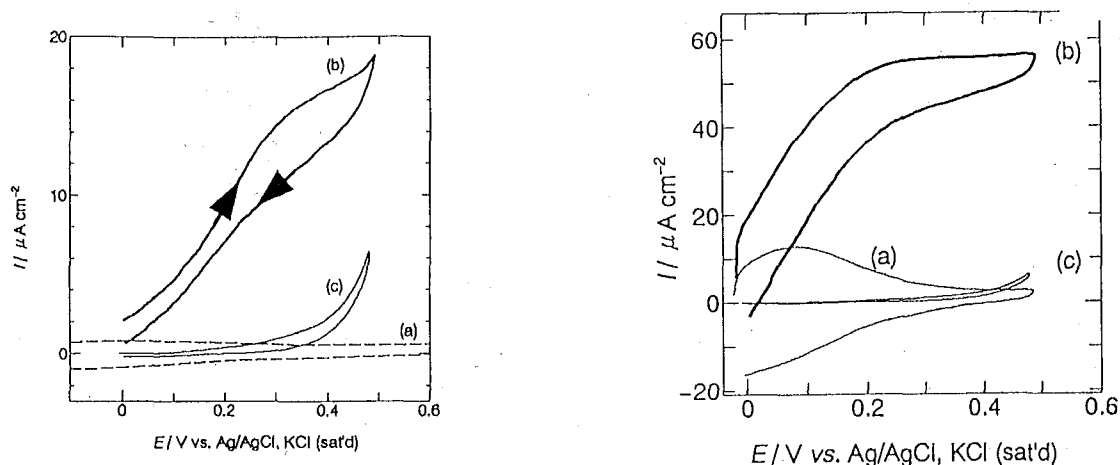


Fig. 4.7. Hydrodynamic voltammograms of thionine - modified BPG electrode (a,b) in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and in the presence (b) of 0.5 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 0.5 mM NADH. Surface coverage (Γ): $0.9 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Potential scan rate: 5.0 mV s^{-1} . Electrode rotation rate: 200 rpm.

Fig. 4.8. Hydrodynamic voltammograms of (a,b) thionine - modified BPG electrode and (c) bare BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and in the presence (b) of 0.5 mM NADH. Surface coverage of thionine (Γ): $6.3 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, Potential scan rate: 5.0 mV s^{-1} , Electrode rotation rate (a,b,c): 200 rpm.

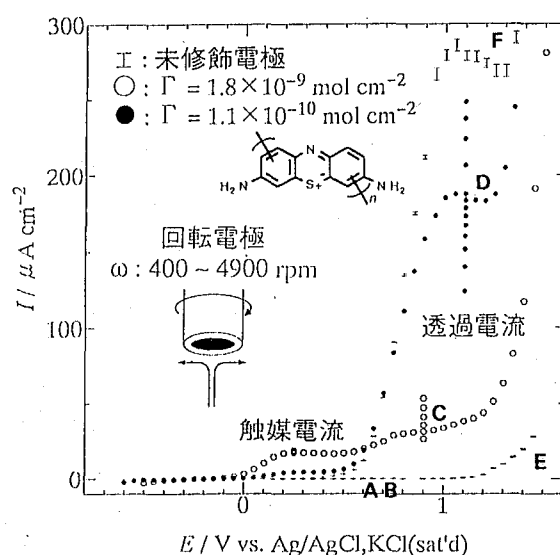


Fig. 4.9. Hydrodynamic voltammograms obtained at thionine - modified (a,b,c,d) and bare (e,f) BPG electrodes in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a,b,e) and in the presence (c,d,f) of 1.0 mM NADH. The steady - state current was measured point by point. Electrode rotation rate: 900rpm for (a - f); 400, 900, 1600, 2500, 3600 and 4900 rpm at 0.25 and 0.9 V for (a,c) Γ : $1.8 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ (b,d), Γ : $1.1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$.

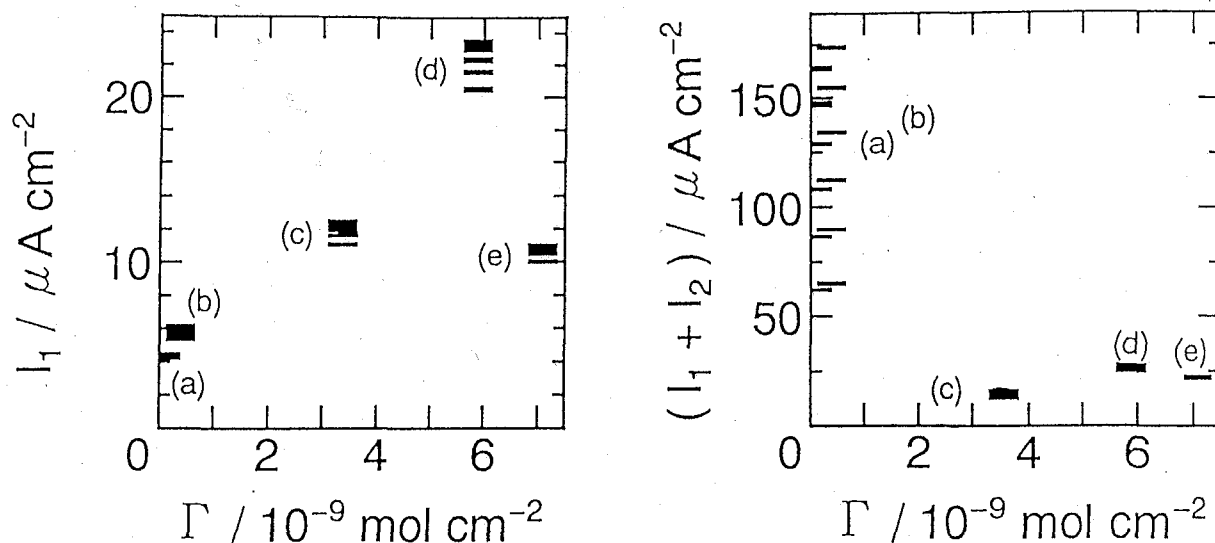


Fig. 4.10. Relationship between surface coverage of thionine - modified electrode (Γ) and (i_1) for oxidation of 1 mM NADH at 0.4 V vs. Ag/AgCl, KCl (sat'd). Electrode rotation rates were varied from 200 to 4900 rpm. The modification of the electrode surfaces by thionine was carried out in acetonitrile containing 10 mM thionine and 0.2 M NaClO₄ as follows: (b)dip - coating ; electrolysis using 50 mV s⁻¹ was carried out as follows; (a)-0.2 to 0.7 V, 10 times, (c)-0.2 to 1.4 V, 10 times, (d)-0.8 to 1.8 V 10 times, with 0.15 M CF₃COOH, (e)-0.2 to 1.4 V, 50min. $\Gamma =$ (a)1.20, (b)3.89, (c)33.6, (d)58.7, (e)70.9 $\times 10^{-10}$ mol cm⁻².

Fig. 4.11. Relationship between surface coverage of thionine - modified electrode (Γ) and ($i_1 + i_2$) for oxidation of 1 mM NADH at 1.1 V vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd). Electrode rotation rates were varied from 200 to 4900 rpm. (a,b,c,d,e) are the same as in Fig.4.10.

General case

$$\frac{d^2 a}{dy^2} - \frac{i_k}{i_S} a \left(1 + \frac{i_S}{i_E} \left\{ a - a_0 - y \left(\frac{da}{dy} \right)_1 \right\} \right) = 0 \quad (1)$$

$$1 - a = \frac{i_S}{i_A} \left(\frac{da}{dy} \right)_1 \quad (2)$$

$$\text{1st wave : } \left(\frac{da}{dy} \right)_0 = 0, \quad i_1 = i_A(1 - a_1) \quad (3)$$

$$\text{2nd wave : } a_0 = 0, \quad i_1 + i_2 = i_A(1 - a_1) \quad (4)$$

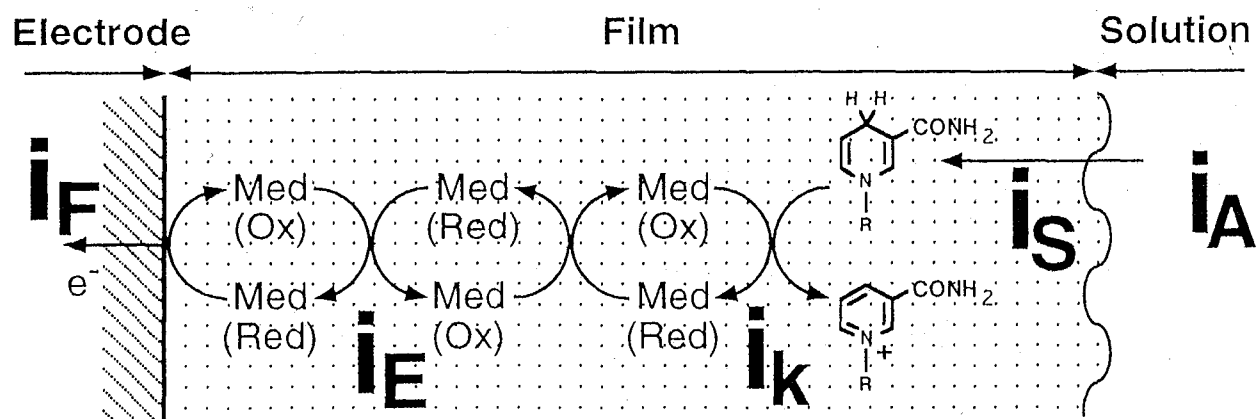
R-case

$$i_E, i_S \gg i_k \quad (5)$$

$$\frac{1}{i_1} = \frac{1}{i_A} + \frac{1}{i_k} \quad (6)$$

$$\frac{1}{i_1 + i_2} = \frac{1}{i_A} + \frac{1}{i_S} \quad (7)$$

Fig. 4.12. The diagnostic criteria for one - step irreversible catalytic reaction proposed by Savéant and co - workers.



$$i_f = i_0[\exp(-\alpha_- F\eta/RT) - \exp(\alpha_+ F\eta/RT)]$$

$$i_E = nFAC_{Ox}^0 D_E/\phi$$

$$i_k = nFAC_P^0 \kappa k_1 C_{Ox}^0 \phi$$

$$i_s = nFAC_P^0 \kappa D_S/\phi$$

$$i_A = nFAC_P^0 D_{soln}/\delta$$

$$(\delta = 4.98 D_{soln}^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2} \text{ cm})$$

Fig. 4.13. Schematic depiction of the electrocatalyzed oxidation of NADH at electrodes coated with polymer films such as thionine and phenosafranine. Ox and Red represent the oxidized and reduced sites, respectively, in the polymer film. i_f is the faradaic current. i_E is the charge propagation current arising from the electron diffusing - like transport in the film. i_k is the current corresponding to the electron cross - reaction between redox site (Ox) and NADH. i_s is the current corresponding to the physical diffusion of NADH in the film. i_A is the Levich current representing the mass transfer of NADH in the solution.

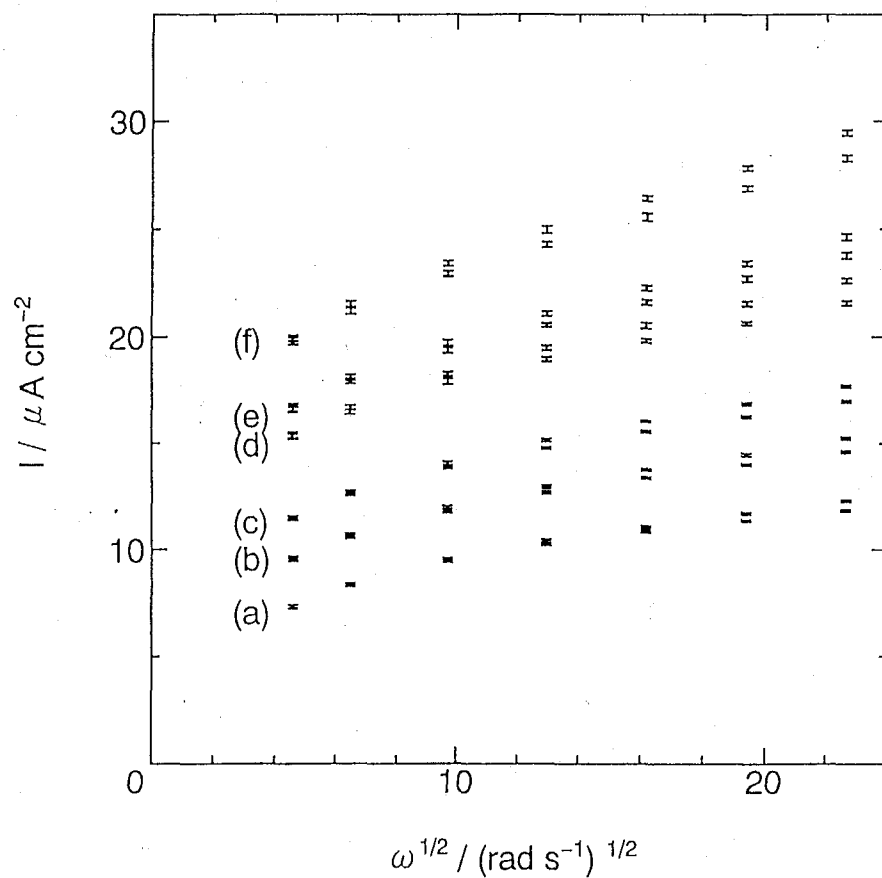


Fig. 4.14. Levich plots of i_1 vs. $\omega^{1/2}$ for the steady - state current - potential curves (a,b,c,d,e,f) at a thionine - modified BPG electrode ($\Gamma = 1.5 \times 10^{-10}$ mol cm^{-2}) in 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) containing (a) 0.1, (b) 0.2, (c) 0.3, (d) 0.5, (e) 0.7, (f) 1.0 mM NADH at 0.4 V vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd). The thionine - modified electrode was prepared by potential - sweep electrolysis for 1 time between -0.8 and $+1.8$ V vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd) in acetonitrile containing 0.1 mM thionine and 0.2 M NaClO_4 .

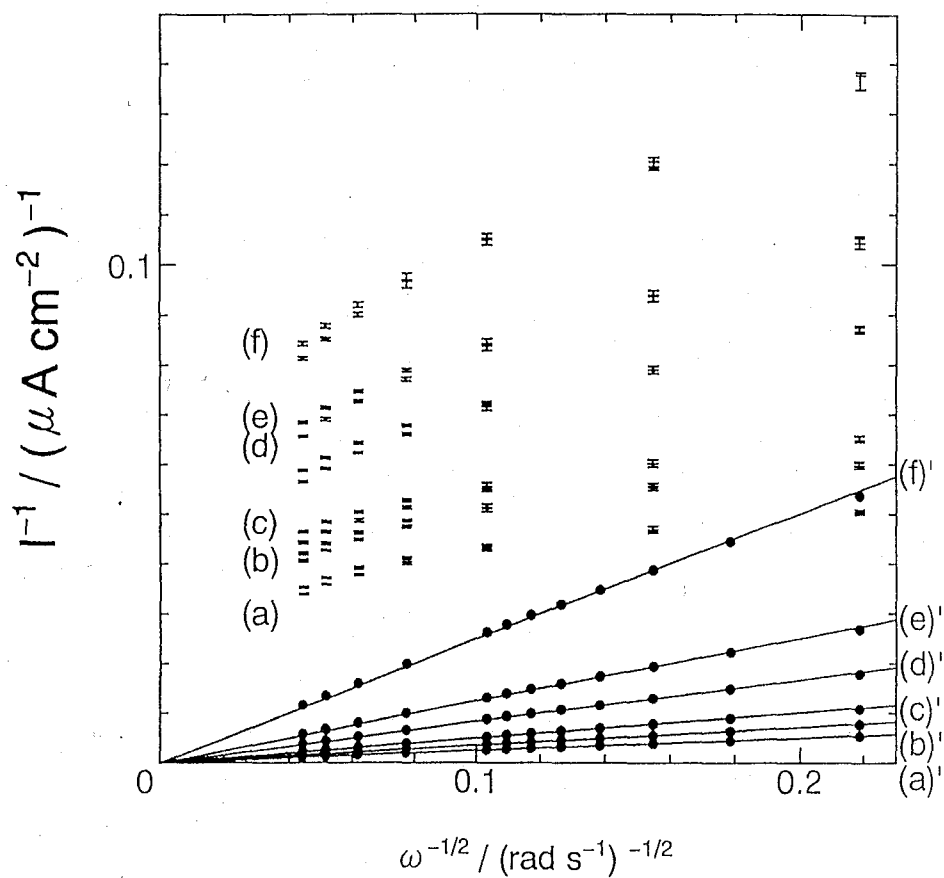


Fig. 4.15. Koutecky - Levich plots of i_1^{-1} vs. $\omega^{-1/2}$ for the data used in Fig.4.14. The points (●) (a' ,b' ,c' ,d' ,e' ,f') correspond to Koutecky - Levich plots at bare BPG electrodes in 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) containing (a)' 0.1, (b)' 0.2, (c)' 0.3, (d)' 0.5, (e)' 0.7, (f)' 1.0 mM NADH.

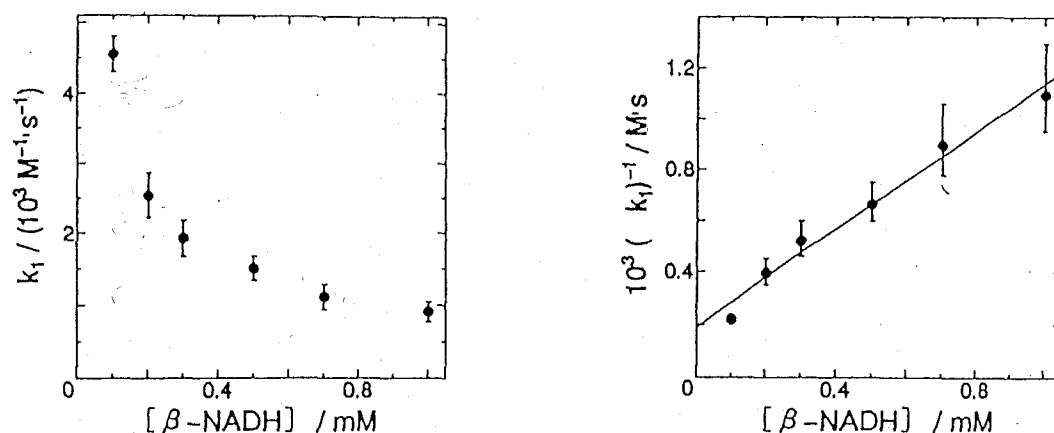
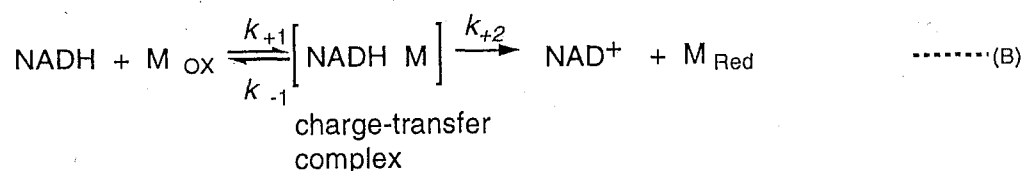
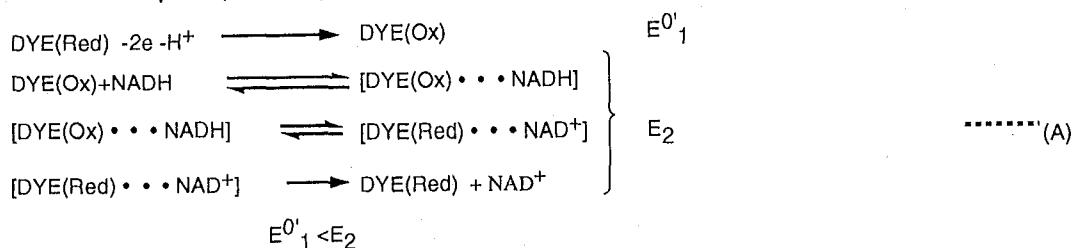


Fig. 4.16. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constants (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by thionine - modified BPG electrode ($\Gamma = 1.5 \times 10^{-10}$ mol cm $^{-2}$) in 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). The values of k_1 were calculated using data in Fig.4.15.

Fig. 4.18. Relationship between concentration of NADH and reciprocal of apparent rate constants (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by thionine - modified BPG electrode ($\Gamma = 1.5 \times 10^{-10}$ mol cm $^{-2}$) in 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).



$$K_S = \frac{[\text{NADH}][\text{M}_{\text{OX}}]}{[\text{NADH M}]} \quad \text{.....(C)}$$

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k_{+1}} \quad \text{.....(D)}$$

(Koutecky Levich Plot)

$$\frac{1}{i_{\text{cat}}} = \frac{1}{nFAk_1\Gamma C_{\text{NADH}}} + \frac{1}{0.620 nFAD^{2/3} C_{\text{NADH}} v^{-1/6} \omega^{1/2}} \quad \text{.....(E)}$$

overall rate constant

$$k_1 = \frac{k_{+2}}{(K_M + C_{\text{NADH}})} \quad \text{.....(F)}$$

$$\frac{1}{k_1} = \frac{K_M}{k_{+2}} + \frac{C_{\text{NADH}}}{k_{+2}} \quad \text{.....(G)}$$

Fig. 4.17. The mechanism proposed by Gorton *et al.* (B - G) and supposed mechanism (A) by the author.

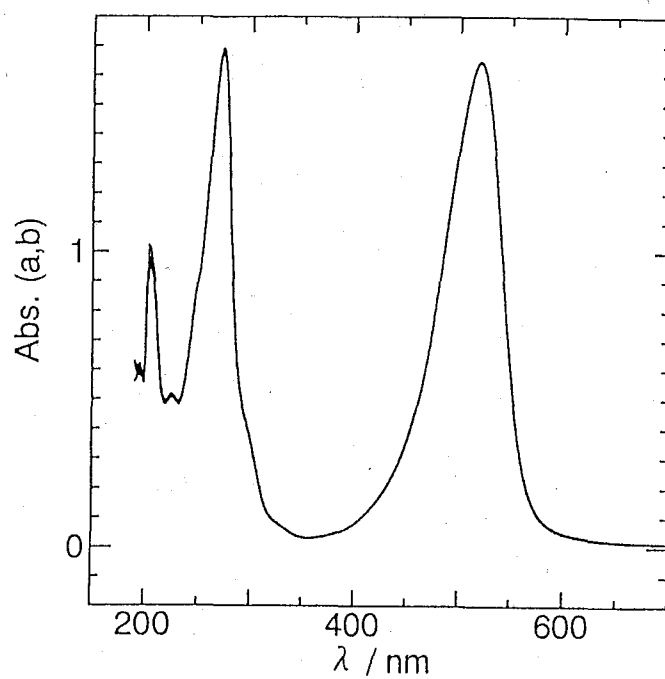


Fig. 4.19. UV - visible spectra of 0.05 mM phenosafranine in deaerated 0.2 M phosphate buffer (pH 7). Spectra were obtained at 109, 206, 581 and 1357 min, respectively.

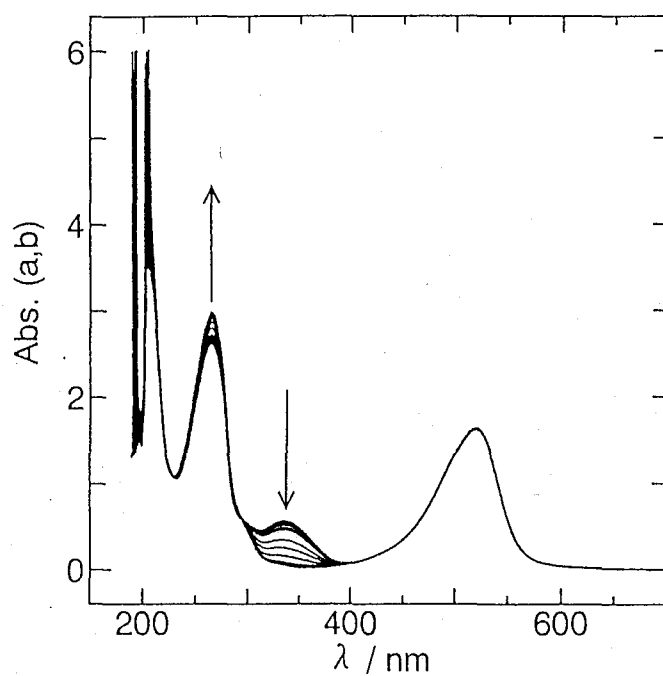


Fig. 4.20. UV - visible spectra of 0.05 mM phenosafranine + 0.1 mM NADH in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7). Spectra were obtained at 6, 11, 20, 37, 58, 74, 145, 217, 317, 450 and 1229 min, respectively.

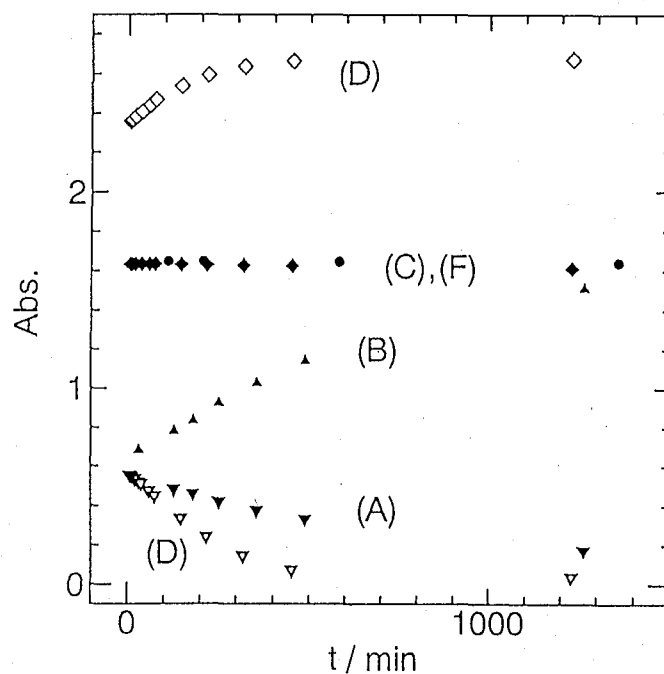


Fig. 4.21. Relationship between time and absorbance for oxidation of 0.1 mM NADH by 0.05 mM phenosafranine in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7). (A) 340 nm of NADH solution (hydrolysis see Fig.4.1); (B) 273 nm of NADH solution (hydrolysis, see Fig.4.1); (C) 520 nm of phenosafranine solution; (D) 340 nm of (NADH + phenosafranine) solution; (E) 273 nm of (NADH + phenosafranine) solution; (F) 520 nm of (NADH + phenosafranine) solution.

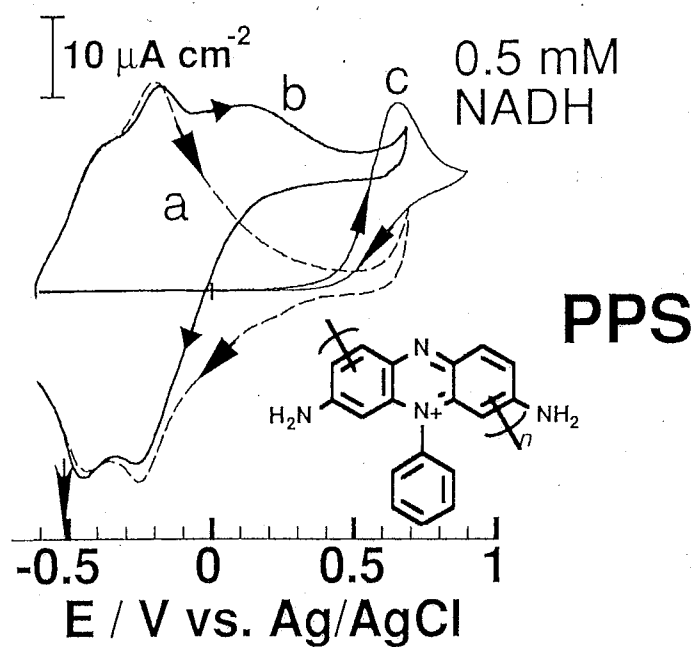


Fig. 4.22. Cyclic voltammograms of (a, b) phenosafranine - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and in the presence (b) of 0.5 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode. Γ : 1.1×10^{-8} mol cm^{-2} . Potential scan rate : 5.0 mV s^{-1} .

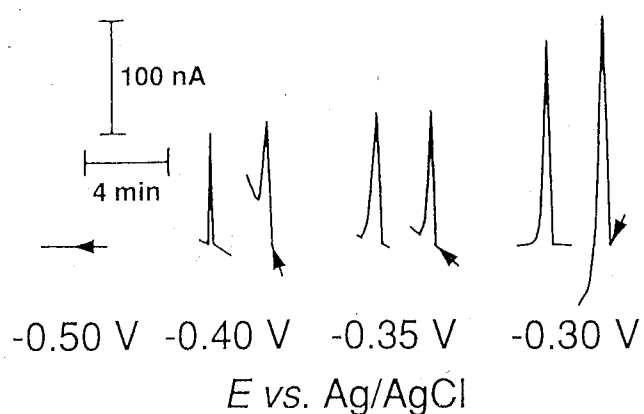


Fig. 4.23. Flow - injection analysis of 1 mM NADH at phenosafranine - modified GC detector. Applied potential: $-0.50, -0.40, -0.35, -0.30 \text{ V vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd)}$.

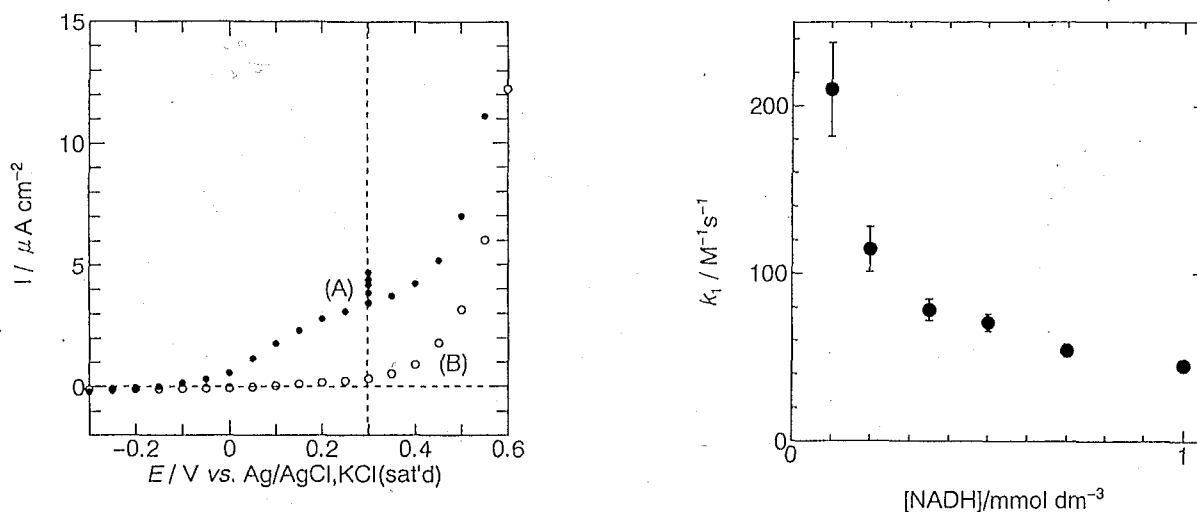


Fig. 4.24. Hydrodynamic voltammograms of phenosafranine - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the presence (A) of 1.0 mM NADH. Electrode rotation rate: 600 rpm. Hydrodynamic voltammogram (B) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 1.0 mM NADH in the same buffer solution. Electrode rotation rate : 900rpm. $\Gamma = 7.0 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$.

Fig. 4.25. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constant k_1 for the catalytic oxidation of NADH by phenosafranine - modified BPG electrode ($\Gamma = 2.72 \text{ to } 2.72 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

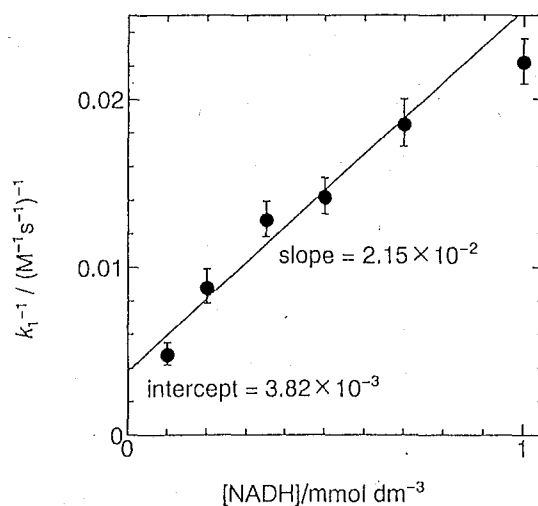


Fig. 4.26. Relationship between concentration of NADH and reciprocal value of apparent rate constant k_1 for the catalytic oxidation of NADH by phenosafranine - modified BPG electrode ($\Gamma = 2.72 \text{ to } 2.72 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$) in 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). $k_{1([NADH]=0)} = 1/\text{intercept} = 2.62 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

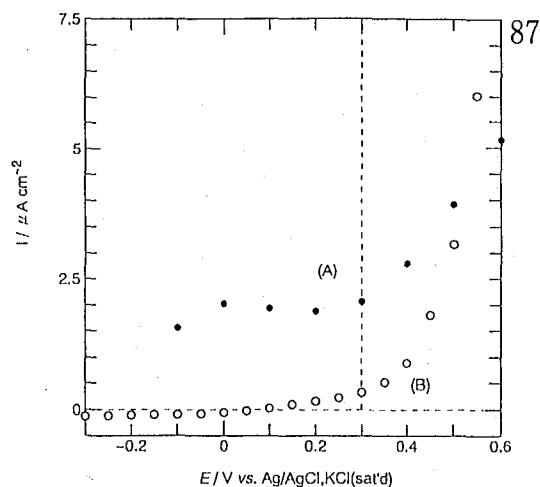
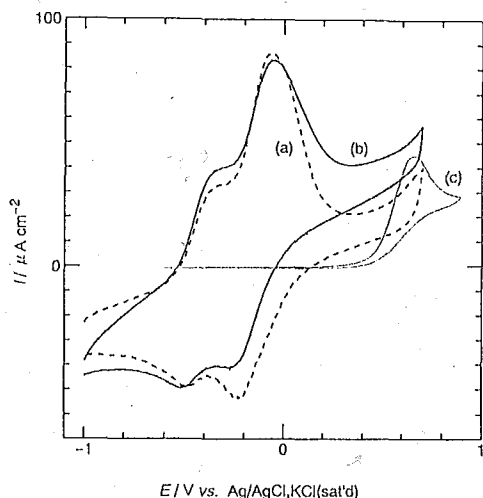


Fig. 4.27. Cyclic voltammograms of $(\text{CH}_3 - \text{phenosafranine})$ - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and the presence (b) of 1.0 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the 1.0 mM NADH solution. Potential scan rate $= 5.0 \text{ mV s}^{-1}$.

Fig. 4.28. Hydrodynamic voltammograms of $(\text{CH}_3 - \text{phenosafranine})$ - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the presence (A) of 1.0 mM NADH. Hydrodynamic voltammogram (B) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 1.0 mM NADH in the same buffer solution. Electrode rotation rate : 900rpm. Electrode rotation rate was varied from 200 to 4900 rpm at 0.3 V.

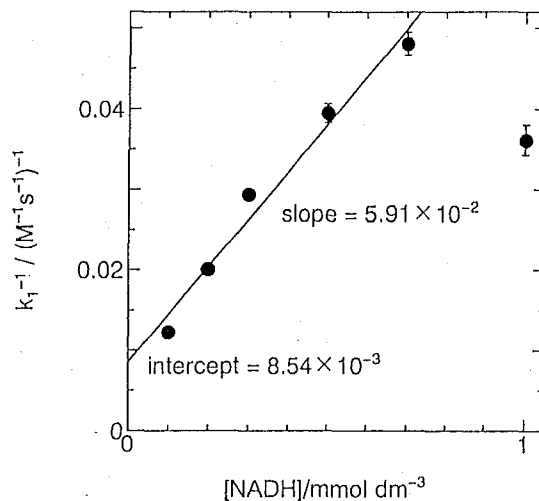
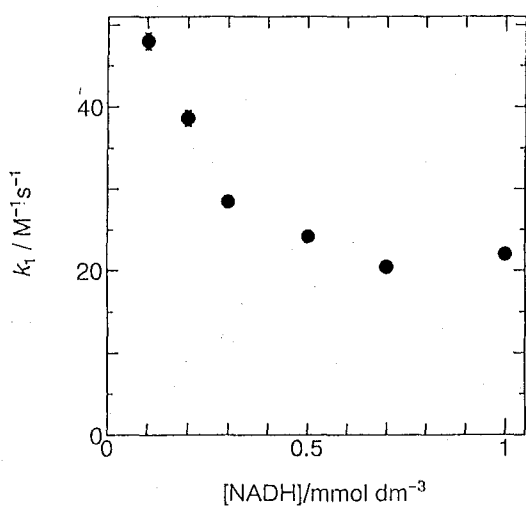


Fig. 4.29. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constants (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by $(\text{CH}_3 - \text{phenosafranine})$ - modified BPG electrode ($\Gamma = 11.0$ to $9.3 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

Fig. 4.30. Relationship between concentration of NADH and reciprocal value of apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by $(\text{CH}_3 - \text{phenosafranine})$ - modified BPG electrode ($\Gamma = 11.0$ to $9.3 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). $k_{1([\text{NADH}] = 0)} = 1/\text{intercept} = 1.17 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

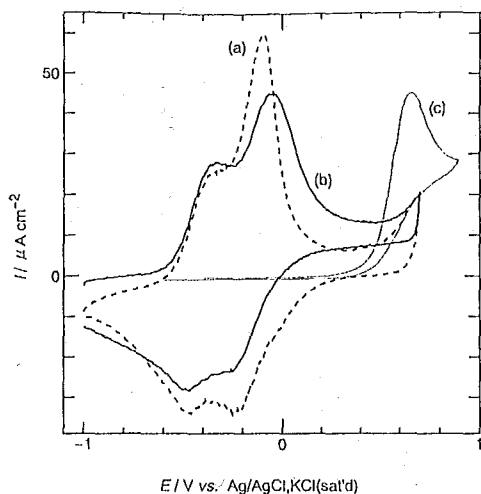


Fig. 4.31. Cyclic voltammograms of $(\text{CH}_3\text{O} - \text{phenosafranine})$ - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and the presence (b) of 1.0 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the 1.0 mM NADH solution. Potential scan rate = 5.0 mV s^{-1} .

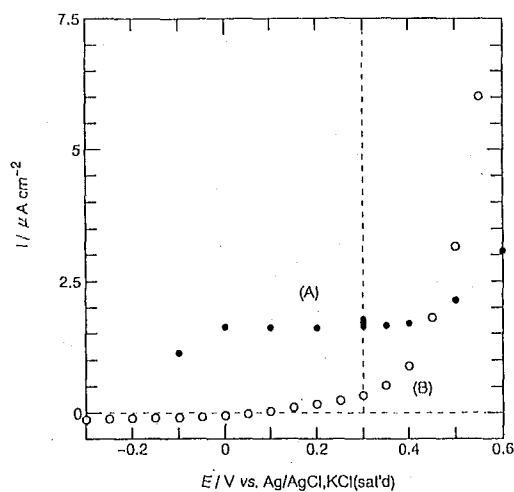


Fig. 4.32. Hydrodynamic voltammograms of $(\text{CH}_3\text{O} - \text{phenosafranine})$ - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the presence (A) of 1.0 mM NADH. Hydrodynamic voltammogram (B) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 1.0 mM NADH in the same buffer solution. Electrode rotation rate : 900rpm. Electrode rotation rate was varied from 200 to 4900 rpm at 0.3 V.

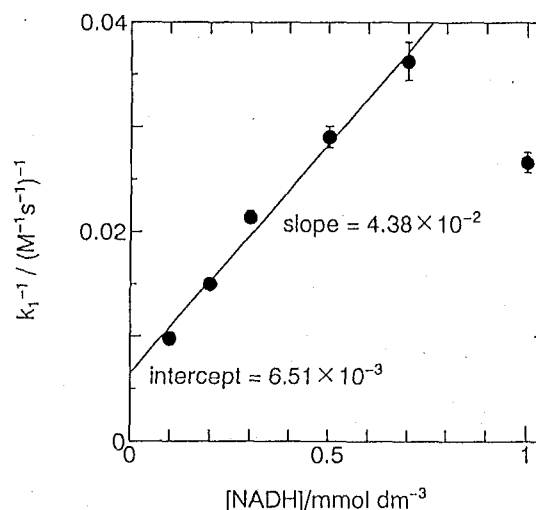
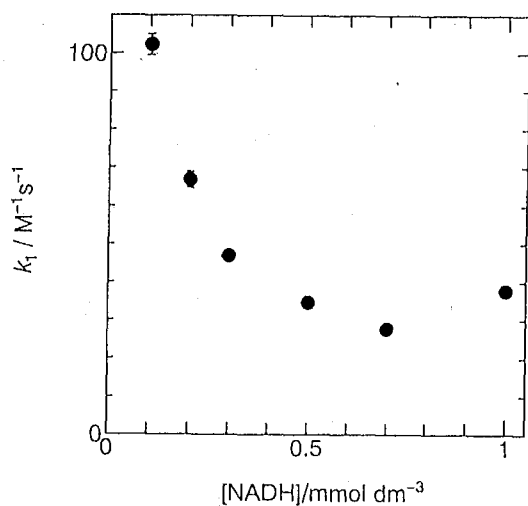


Fig. 4.33. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by $(\text{CH}_3\text{O} - \text{phenosafranine})$ - modified BPG electrode ($\Gamma = 7.2$ to $6.8 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$) in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

Fig. 4.34. Relationship between concentration of NADH and reciprocal value of apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by $(\text{CH}_3\text{O} - \text{phenosafranine})$ - modified BPG electrode ($\Gamma = 7.1$ to $6.4 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$) in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). $k_{1([\text{NADH}] = 0)} = 1/\text{intercept} = 1.54 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

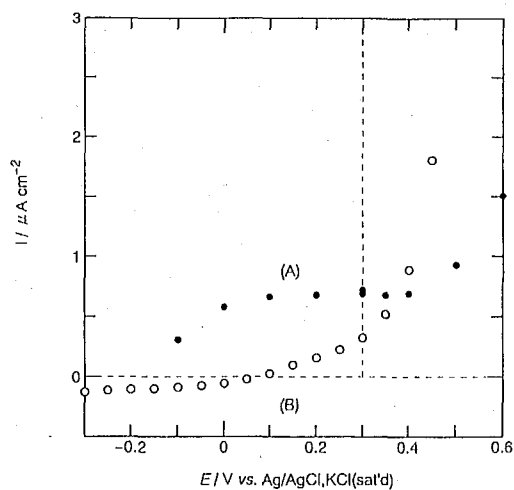
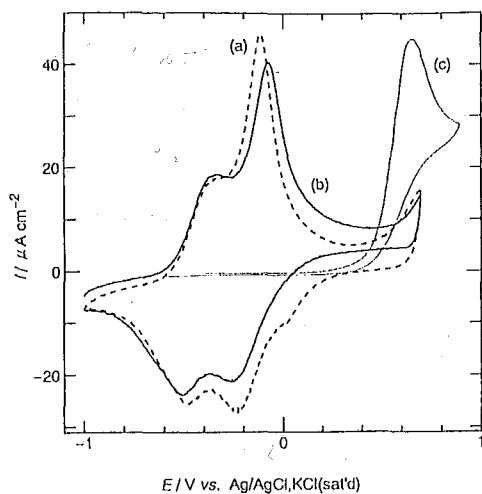


Fig. 4.35. Cyclic voltammograms of (*i* - Pr - phenosafranine) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and the presence (b) of 1.0 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the 1.0 mM NADH solution. Potential scan rate = 5.0 mV s^{-1} .

Fig. 4.36. Hydrodynamic voltammograms of (*i* - Pr - phenosafranine) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the presence (A) of 1.0 mM NADH. Hydrodynamic voltammogram (B) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 1.0 mM NADH in the same buffer solution. Electrode rotation rate : 900rpm. Electrode rotation rate was varied from 200 to 4900 rpm at 0.3 V.

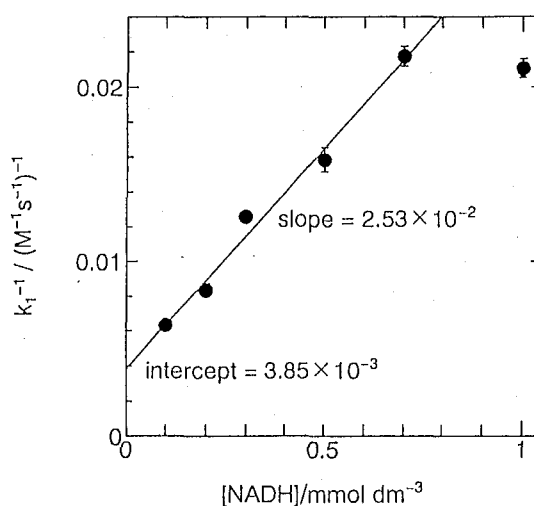
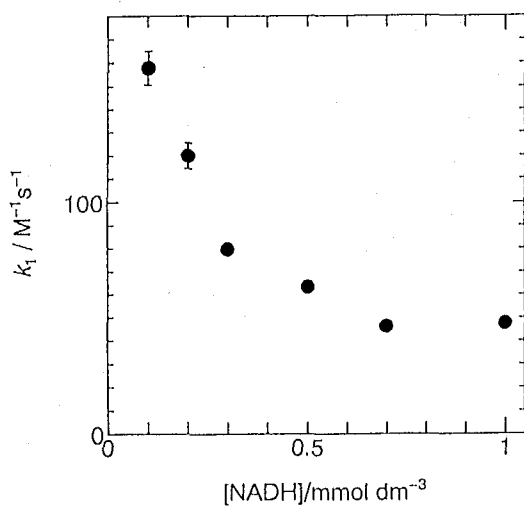


Fig. 4.37. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by (*i* - Pr - phenosafranine) - modified BPG electrode ($\Gamma = 8.4$ to $6.4 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

Fig. 4.38. Relationship between concentration of NADH and reciprocal value of apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by (*i* - Pr - phenosafranine) - modified BPG electrode ($\Gamma = 8.4$ to $6.4 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). $k_{1([\text{NADH}] = 0)} = 1/\text{intercept} = 2.60 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

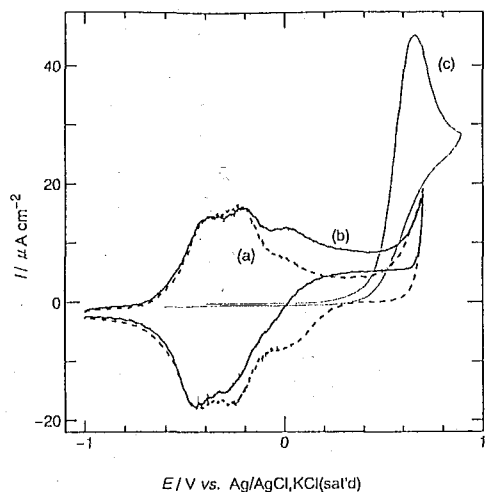


Fig. 4.39. Cyclic voltammograms of (NO_2 - phenosafranine) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and the presence (b) of 1.0 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the 1.0 mM NADH solution. Potential scan rate = 5.0 mV s^{-1} .

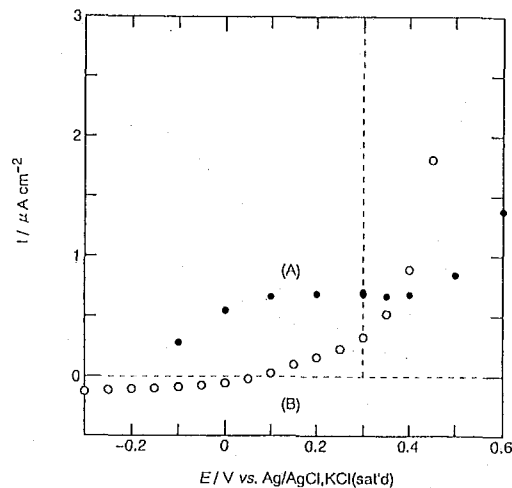


Fig. 4.40. Hydrodynamic voltammograms of (NO_2 - phenosafranine) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the presence (A) of 1.0 mM NADH. Hydrodynamic voltammogram (B) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 1.0 mM NADH in the same buffer solution. Electrode rotation rate : 900rpm. Electrode rotation rate was varied from 200 to 4900 rpm at 0.3 V.

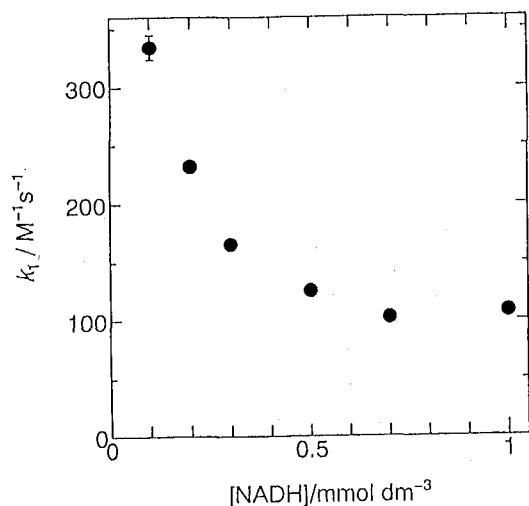


Fig. 4.41. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by (NO_2 - phenosafranine) - modified BPG electrode ($\Gamma = 3.8$ to $3.6 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

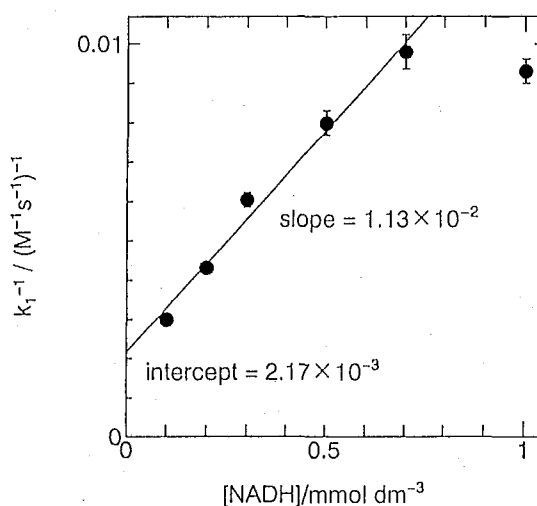


Fig. 4.42. Relationship between concentration of NADH and reciprocal value of apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by (NO_2 - phenosafranine) - modified BPG electrode ($\Gamma = 3.8$ to $3.6 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). $k_{1([NADH]=0)} = 1/\text{intercept} = 4.61 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

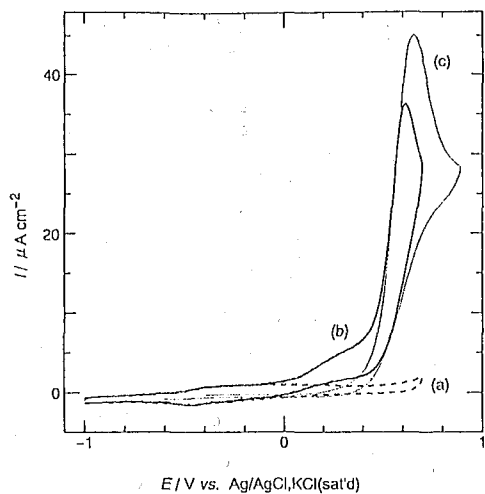


Fig. 4.43. Cyclic voltammograms of (safranine - O) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and the presence (b) of 1.0 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the 1.0 mM NADH solution. Potential scan rate = 5.0 mV s^{-1} .

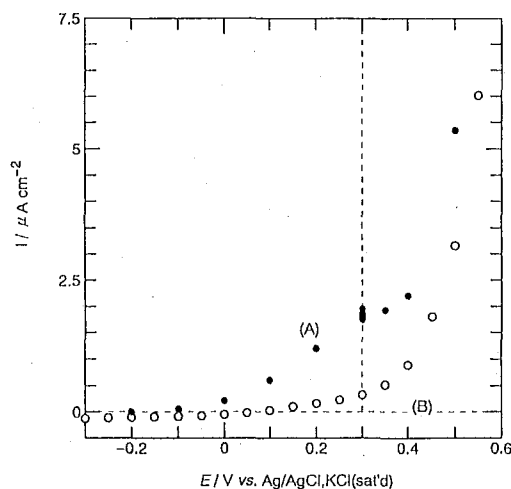


Fig. 4.44. Hydrodynamic voltammograms of (safranine - O) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the presence (A) of 1.0 mM NADH. Hydrodynamic voltammogram (B) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 1.0 mM NADH in the same buffer solution. Electrode rotation rate : 900rpm. Electrode rotation rate was varied from 200 to 4900 rpm at 0.3 V.

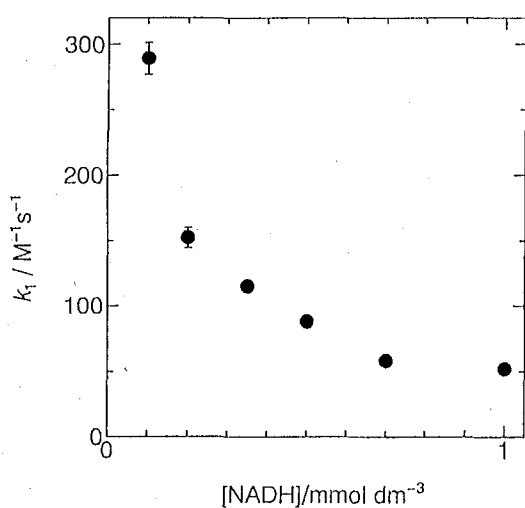


Fig. 4.45. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by (safranine - O) - modified BPG electrode ($\Gamma = 2.63$ to $2.29 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$) in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

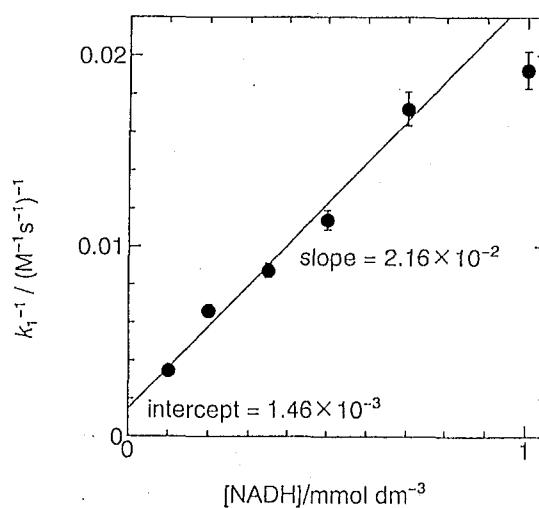


Fig. 4.46. Relationship between concentration of NADH and reciprocal value of apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by (safranine - O) - modified BPG electrode ($\Gamma = 2.63$ to $2.29 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$) in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). $k_{1([\text{NADH}] = 0)} = 1/\text{intercept} = 6.85 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

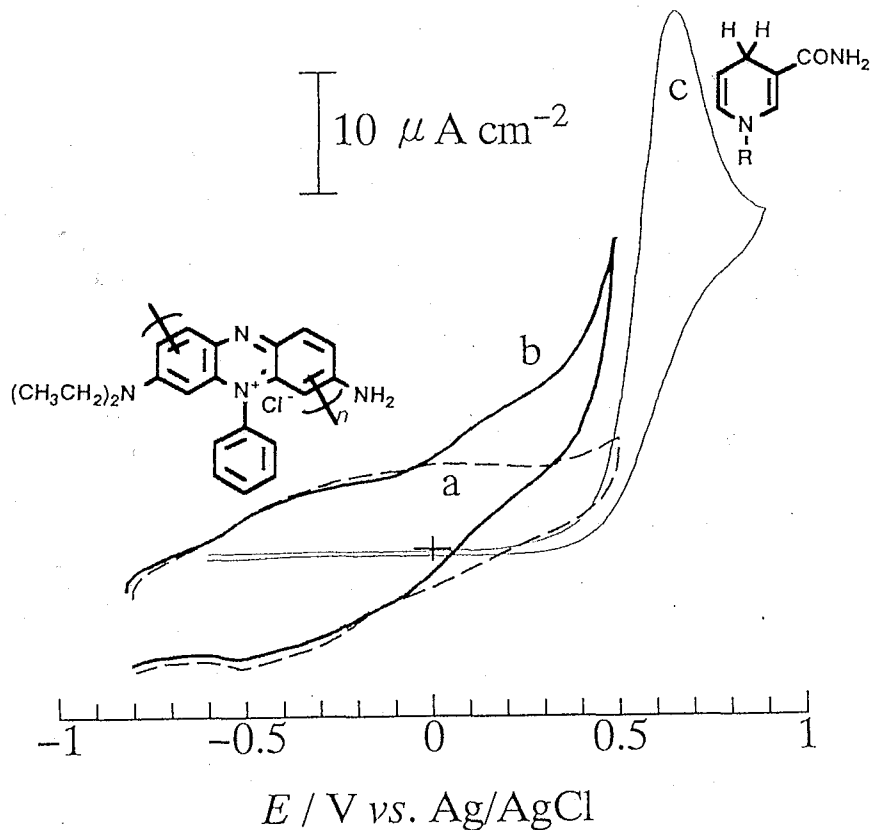


Fig. 4.47. Cyclic voltammograms of (methylene violet 3RAX) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and the presence (b) of 1.0 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the 1.0 mM NADH solution. Potential scan rate = 5.0 mV s⁻¹.

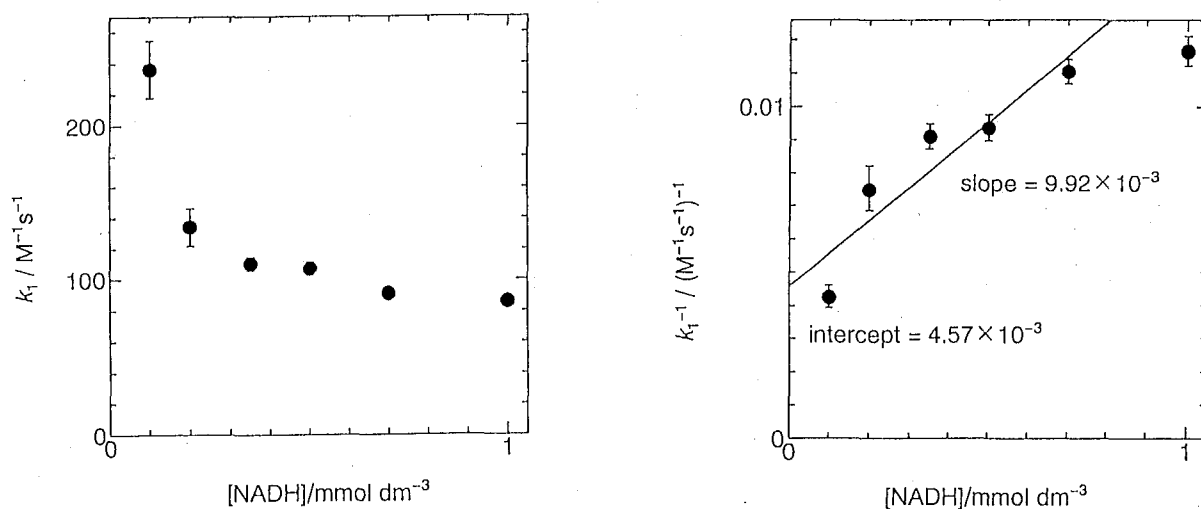


Fig. 4.48. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constants (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by methylene violet 3RAX - modified BPG electrode ($\Gamma = 2.18$ to 2.09×10^{-10} mol cm⁻²) in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

Fig. 4.49. Relationship between concentration of NADH and reciprocal value of apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by methylene violet 3RAX - modified BPG electrode ($\Gamma = 2.18$ to 2.09×10^{-10} mol cm⁻²) in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). $k_{1([NADH]=0)} = 1/\text{intercept} = 2.19 \times 10^2$ M⁻¹ s⁻¹.

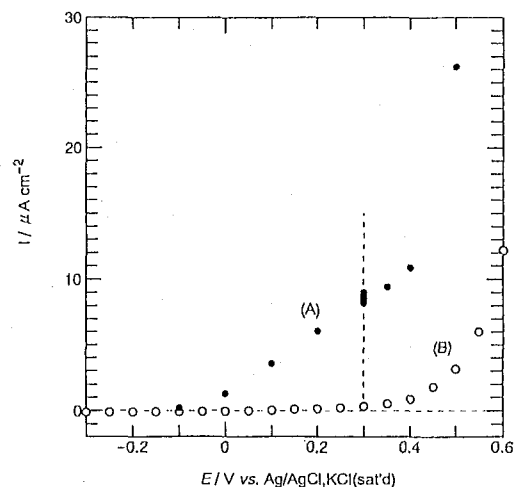
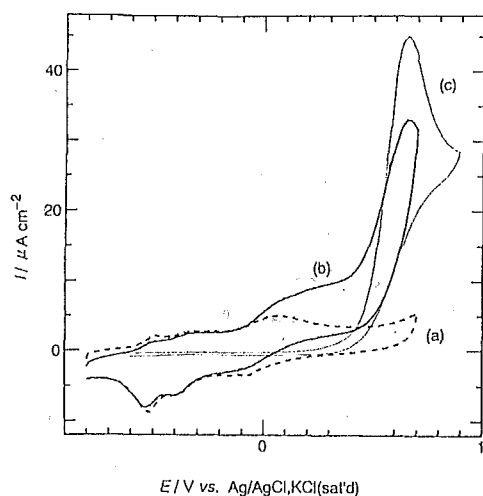


Fig. 4.50. Cyclic voltammograms of (indoine blue) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and the presence (b) of 1.0 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the 1.0 mM NADH solution. Potential scan rate = 5.0 mV s^{-1} .

Fig. 4.51. Hydrodynamic voltammograms of (indoine blue) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the presence (A) of 1.0 mM NADH. Hydrodynamic voltammogram (B) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 1.0 mM NADH in the same buffer solution. Electrode rotation rate : 900rpm. Electrode rotation rate was varied from 200 to 4900 rpm at 0.3 V.

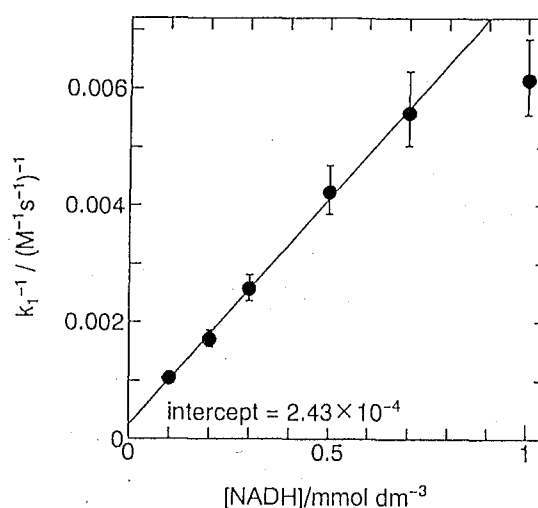
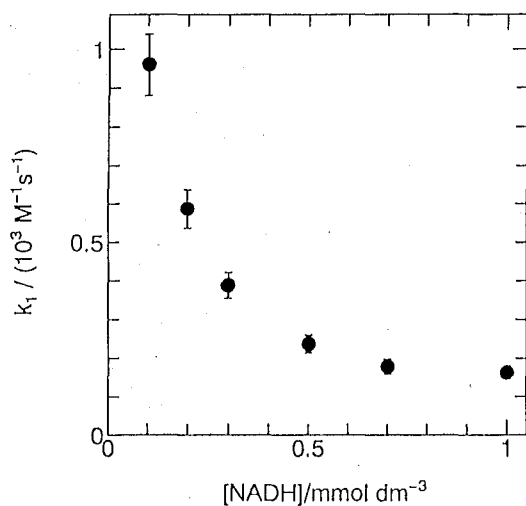


Fig. 4.52. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by (indoine blue) - modified BPG electrode ($\Gamma = 2.1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

Fig. 4.53. Relationship between concentration of NADH and reciprocal value of apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by (indoine blue) - modified BPG electrode ($\Gamma = 2.1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

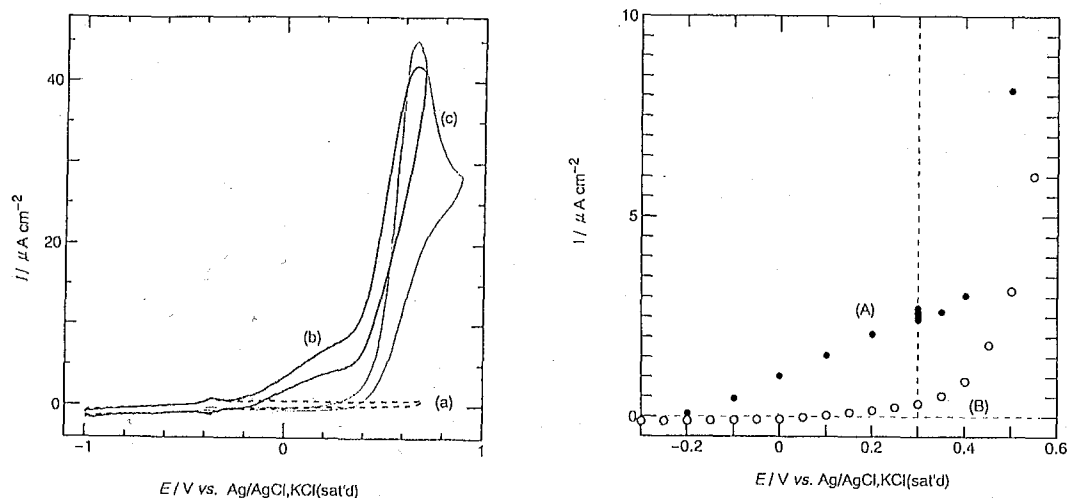


Fig. 4.54. Cyclic voltammograms of (phenazine methosulfate) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and the presence (b) of 1.0 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the 1.0 mM NADH solution. Potential scan rate = 5.0 mV s^{-1} .

Fig. 4.55. Hydrodynamic voltammograms of (phenazine methosulfate) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the presence (A) of 1.0 mM NADH. Hydrodynamic voltammogram (B) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 1.0 mM NADH in the same buffer solution. Electrode rotation rate : 900rpm. Electrode rotation rate was varied from 200 to 4900 rpm at 0.3 V.

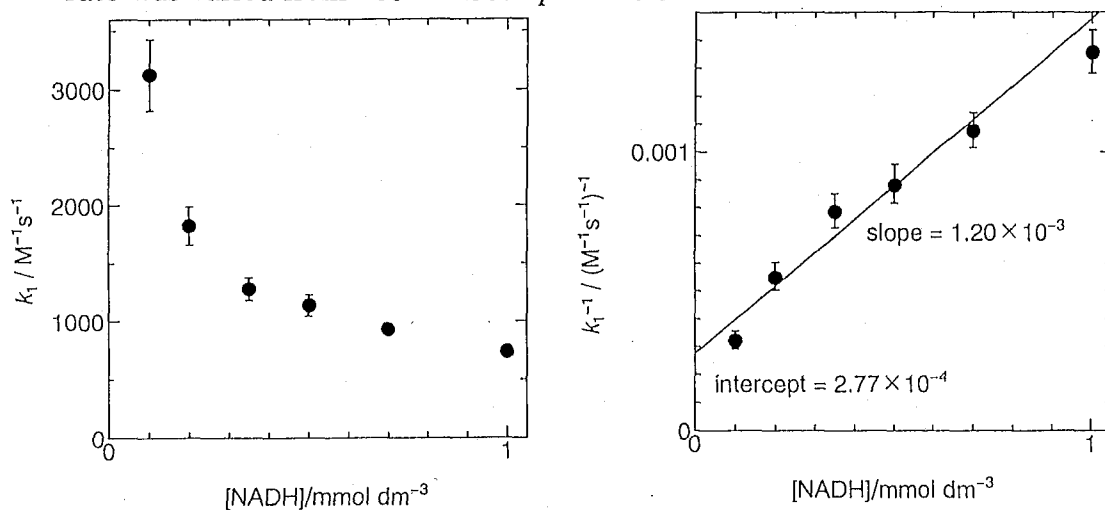


Fig. 4.56. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by (phenazine methosulfate) - modified BPG electrode ($\Gamma = 0.00653 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

Fig. 4.57. Relationship between concentration of NADH and reciprocal value of apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by (phenazine methosulfate) - modified BPG electrode ($\Gamma = 0.00653 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). $k_{1([NADH]=0)} = 1/\text{intercept} = 3.61 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

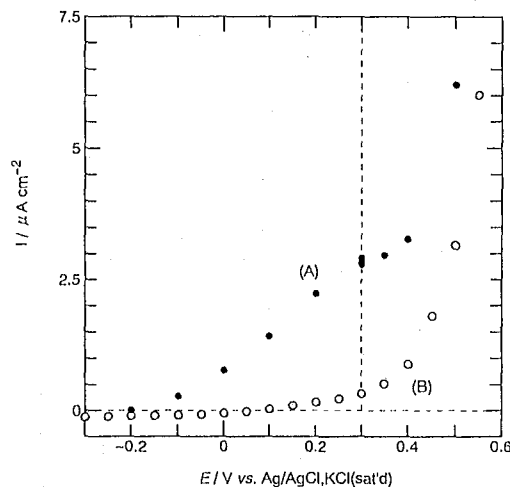
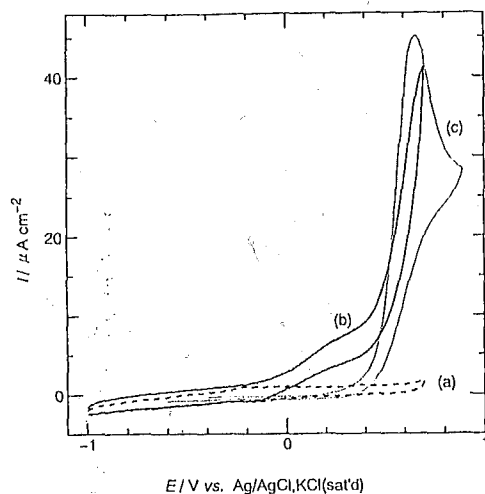


Fig. 4.58. Cyclic voltammograms of (phenazine ethosulfate) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and the presence (b) of 1.0 mM NADH. Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the 1.0 mM NADH solution. Potential scan rate = 5.0 mV s^{-1} .

Fig. 4.59. Hydrodynamic voltammograms of (phenazine ethosulfate) - modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the presence (A) of 1.0 mM NADH. Hydrodynamic voltammogram (B) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 1.0 mM NADH in the same buffer solution. Electrode rotation rate : 900rpm. Electrode rotation rate was varied from 200 to 4900 rpm at 0.3 V.

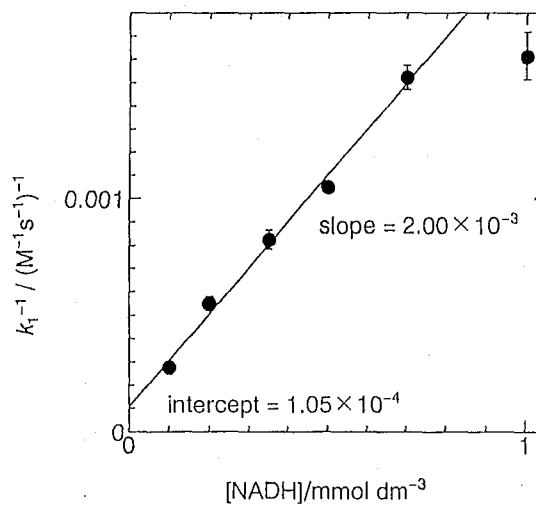
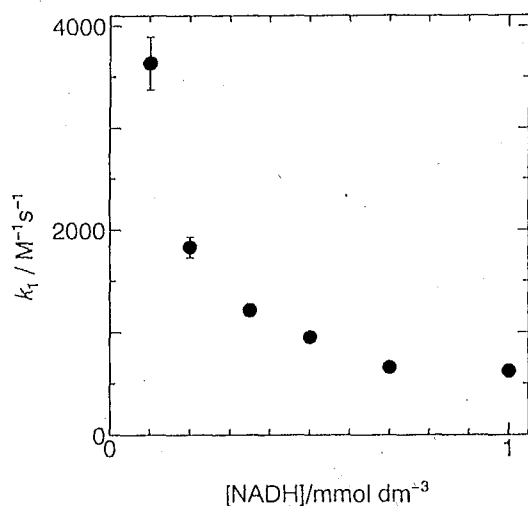


Fig. 4.60. Relationship between concentration of NADH and apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by phenazine ethosulfate - modified BPG electrode ($\Gamma = 0.105$ to $0.0881 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

Fig. 4.61. Relationship between concentration of NADH and reciprocal value of apparent rate constant (k_1) for the catalytic oxidation of NADH by phenazine ethosulfate - modified BPG electrode ($\Gamma = 0.00765$ to $0.00513 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). $k_{1([\text{NADH}] = 0)} = 1/\text{intercept} = 9.52 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

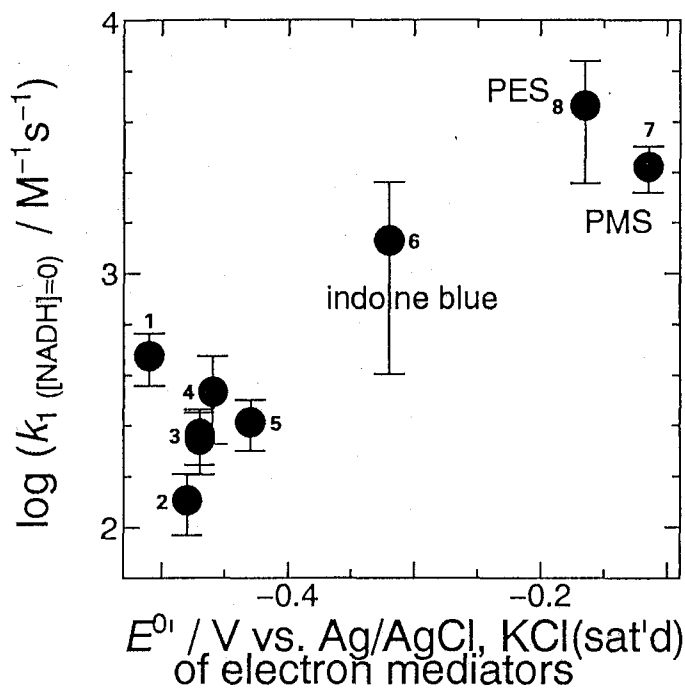


Fig. 4.62. $\log(k_{1[NADH]=0} / M^{-1} s^{-1})$ for the oxidation of NADH *vs.* $E^{o'}$ of the phenosafranine derivatives); $\Gamma = 2 - 10 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

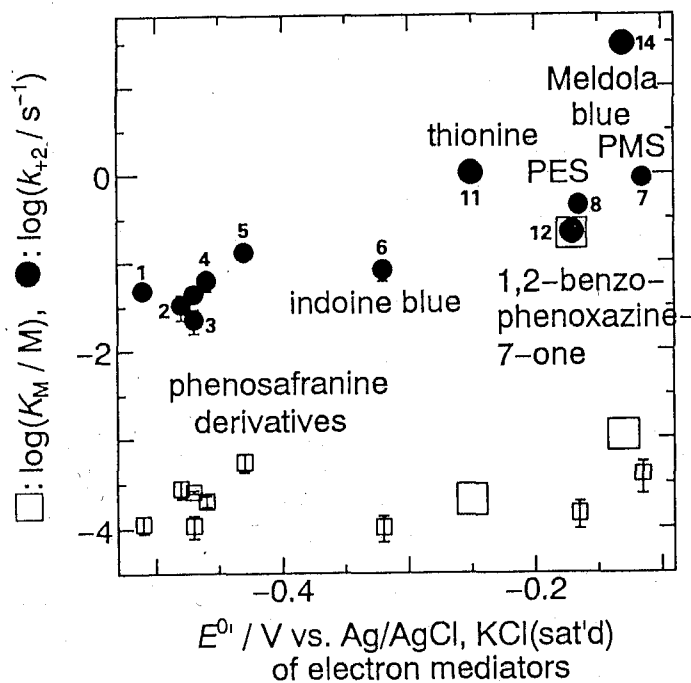


Fig. 4.63. $\log(k_{+2}/s^{-1})$ (●) and $\log(K_M/M)$ (□) *vs.* $E^{o'}$ of the phenosafranine derivatives ; $\Gamma = 2 - 10 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ in 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

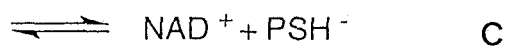
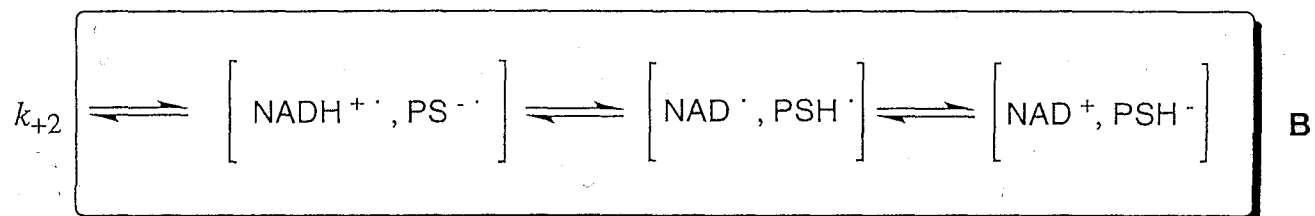
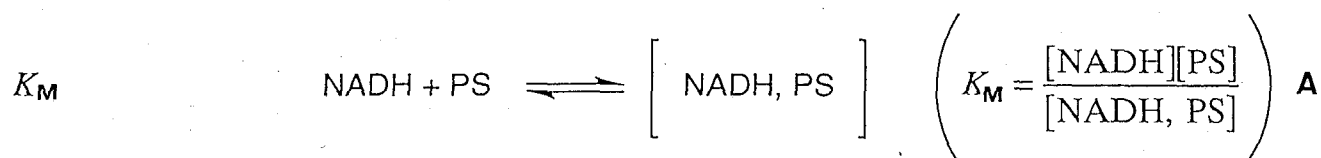


Fig. 4.64. 3 stages of catalytic oxidation of NADH. (A) complex formation, (B) electron transfer, (C) complex deformation.

第 5 章

半経験的分子軌道法による考察

5.1 緒言

NADHの酸化剤として有効に働く有機化合物の構造に関する知見は、多くの研究者によって明らかにされてきた。特定の化学構造—すなわち、*o*-キノン骨格、*p*-キノン骨格、フェノチアジン骨格、フェノキサジン骨格、フェナジン骨格—を持つ有機化合物が経験的に選び出された(例えばFig.5.1の物質およびTable5.2の文献、また[79]を参照)。このような一連の系列の化学構造を有する酸化剤においては、酸化剤のレドックス電位が正であるほどNADHの酸化反応の速度定数は大きいということが明らかにされてきている。Fig. 5.1は、これまで報告されている酸化剤の式量レドックス電位に対して、NADHの酸化反応速度定数をプロットした図である。*o*-キノン、*p*-キノンの構造を有する一連の酸化剤の中では、酸化剤の式量レドックス電位 E° が正であればあるほど反応速度定数が大きくなるということを、Carlson, Miller らが報告している[27]。Fig. 5.1 のNo.17-23(□)が*o*-キノン系列であり、No.24-28(○)が*p*-キノン系列である。

彼らはまた、ほぼ同じ式量レドックス電位をもつ*o*-キノン誘導体および*p*-キノン誘導体がNADHを酸化する場合に、*o*-キノン誘導体によるNADH酸化反応速度定数が*p*-キノン誘導体のそれよりも2桁大きいという実験事実を報告している[27]。しかしながら、両系列の反応速度定数が2桁異なることについては、説明がされていない。

本研究で扱ったアジン色素群はキノン系列よりも式量レドックス電位が負である。Fig. 5.1 のNo.1-8(●)がフェノサフラニン誘導体であり、No.11(■)がチオニンである。この色素群のNADH酸化反応速度定数は、フェノサフラニンでは $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、そしてチオニンでは $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ のオーダーである(第4

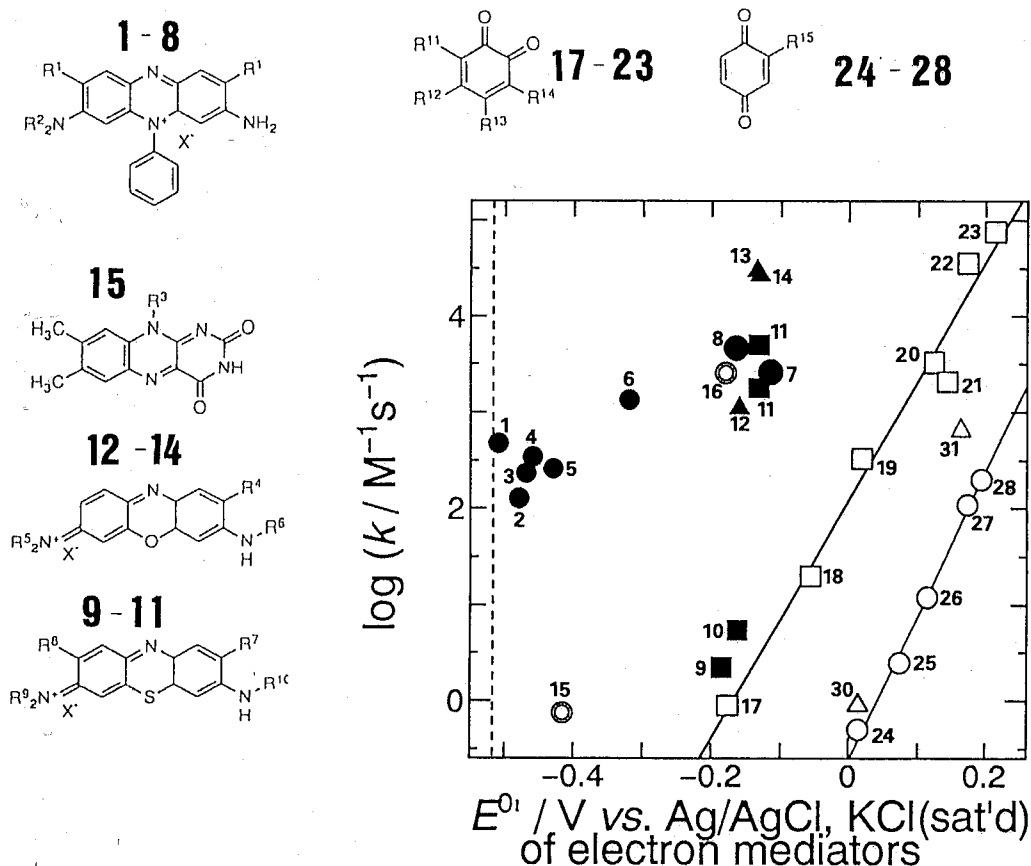


Fig. 5.1. Correlation between rate constant k for NADH oxidation and formal redox potential $E^{o'}$ of electron-transfer mediators. Experimental conditions: (1 - 4, 7 - 32) aqueous buffer solution, pH 7.0, 25°, ionic strength = 0.05 - 0.20; (5) aqueous buffer solution, pH 6.65, 30°. Methods: (1 - 8, 12 - 14, 16) hydrodynamic voltammetry with modified electrodes; (21, 27, 28) cyclic voltammetry; (20, 22, 23) double potential step chronocoulometry; (24 - 26) polarography; (9 - 11, 15, 17 - 19, 30, 31) spectrophotometric method (15, 30, 31). 1 - 8 (●): phenazines; 9 - 11 (■): phenothiazines; 12 - 14 (▲): phenoxazines; 15, 16 (⊙): flavins; 17 - 23 (□): *o*-quinones; 24 - 28 (○): *p*-quinones; 1 = safranine - O, 2 = CH₃O - phenosafranine, 3 = CH₃ - phenosafranine, 4 = phenosafranine, 5 = methylene violet 3RAX, 6 = indoine blue, 7 = (PMS) phenazine methosulfate, 8 = (PES) phenazine ethosulfate, 9 = methylene blue, 10 = toluidine blue - O, 11 = thionine, 12 = 1,2 - benzophenoxazine - 7 - one, 13 = 3-β-naphthoyl brilliant cresyl blue, 14 = meldola blue, 15 = riboflavin, 16 = mercapto - 6,8 - diazaflavin, 17 = 9,10 - phenanthrenequinone, 18 = 1,2 - naphthoquinone, 19 = 1,2 - naphthoquinone - 4 - sulfonate, 20 = 4 - methylcatechol, 21 = (3 - chloro - 1,2 - benzoquinone - 5 - yl)acetic acid, 22 = dopamine, 23 = 3,4 - dihydroxybenzylamine, 24 = 2 - methyl - 1,4 - benzoquinone, 25 = 1,4 - benzoquinone, 26 = 2 - chloro - 1,4 - benzoquinone, 27 = 2 - carboxy - 1,4 - benzoquinone, 28 = 2 - cyano - 1,4 - benzoquinone, 30 = dichloroindophenol, 31 = TCNQ. The data of k and $E^{o'}$: 1 - 8 (this work), 15 (Suelter *et al.*), 16 (Vasquez *et al.*), 9 - 11, 30, 31 (Bennetto *et al.*), 12 - 14 (Gorton *et al.*), 17 - 19, 21 (Tse *et al.*), 20, 22 - 28 (Kulys *et al.*).

章)。これらの速度定数の値は、同じ式量レドックス電位で比較すると、フェノチアジン(No.9-11, ■)やフェノキサジン(No.12-14, ▲)などの色素に対して報告されている値より大きい。

しかしながら、ほぼ同じレドックス電位を有する系列の異なる酸化剤の反応速度定数の違いに関する議論は行われていない。

そこで、第5章では次の2つの実験事実の理由を明らかにすることを目的とする。

1. 同じ式量レドックス電位で比較すると、*o*-キノン系列と*p*-キノン系列の反応速度定数が大きく(約2桁)異なる。
2. 同じ式量レドックス電位で比較すると、アジン色素の方がキノン系列よりも一般に反応速度定数が大きい。

すなわち、「異なる化学構造を持ち、同じ式量レドックス電位を有する酸化剤を比較する場合、NADHの酸化反応に対する反応速度定数が異なるのはなぜか」という観点から、電子移動メディエーターの化学構造と触媒反応速度定数との関係を解釈し、「目的に応じた電子移動メディエーターの選択指針、設計指針」のための基本概念を明らかにすることを目的とする。

NADHと酸化剤の間で電子移動が起こるためには、それぞれの分子が近づいて相互作用をする必要がある。「2分子間の相互作用をなんらかの形で定量化して説明すること」および「NADHの酸化反応速度定数の大小を分子間の相互作用の大小で説明すること」を本章の目的とした。定量化の手段として半経験的分子軌道法を用い、それぞれの分子について分子軌道の計算を行なった。

5.2 計算方法

5.2.1 計算プログラム

計算機としては、東京工業大学総合情報処理センターのCrayスーパーコンピュータ(CRAY C916/12256, 計算機名c90, c90.cc.titech.ac.jp)を用いた。プログラムとして、半経験的分子軌道法計算プログラムパッケージmopac(モープック) ver. 6.0[117],[118],[119],[120]を用いた。NECパーソナルコンピュータに移植されたMOPAC ver.7, ver.6(日本化学プログラム交換機構より入手したもの)も、一部用いた。計算方法は、PM3(MNDO(Modified Neglect of Diatomic Overlap)-Parametric Method 3)法[120]を用いた。この方法は、Michel J. S. Dewarが化学反応をシミュレートするための「化学的正確さ」を

持った近似計算法として開発したものである。AM1(MNDO–Austin Model 1)法, PM3法に至って, Dewarらが企図した「化学的正確さ」はほぼ達成されたといつてよく, 分子の生成熱が数 kcal mol⁻¹以内の誤差で求められるようになっていいる。AM1法とPM3法は, 一般的な化学者が興味を持つような比較的大きな系の化学を量子化学的に取り扱うための現在ほとんど唯一の方法[120]であることが知られている。HOMO(最高被占軌道), LUMO(最低空軌道)の図示には分子軌道計算結果の可視化ソフト FAIRY RING for Windows (Donationware, Ver.0.13, (1995))を用いた。

5.3 結果および考察

5.3.1 予備計算

MOPAC6が正常作動していることの確認および計算結果の信頼性を確認する必要がある。MOPACマニュアル[117]によれば, 次に挙げるいくつかの低分子の生成熱を計算させてマニュアルに記載されている値と比較する方法によって, 正常動作を確かめることができる。

計算条件は, 以下の通りである。

- (1)PM3。計算のハミルトニアンとしてPM3を採用する。
- (2)EF。固有ベクトル追跡(Eigenvector Following)ルーチンを起動する。
- (3)VECTORS。固有ベクトルを印字する。

SCF(“つじつまの合う場”の方法, Self-Consistent Field法)計算を行なった。

Table 5.1の結果より, マニュアルの生成熱の値を再現するのでc90.cc.titech.ac.jpでのmopac6の計算は, 正常に行われていることがわかった。

Table 5.1. The calculated values for heat of formation(ΔH_f) of selected molecules.

molecules	ΔH /kcal mol ⁻¹	ΔH /kcal mol ⁻¹
	values on the MOPAC manual	calculated in this study
CH ₄	-13.0	-13.0
NH ₃	-3.1	-3.07
CO ₂	-85.0	-85.0
H ₂ S	-0.9	-0.913

5.3.2 キノン, 色素, NADHモデル化合物のHOMO, LUMO

キノン, 色素およびNADHモデル化合物(1,4-ジヒドロ-N-メチルニコチンアミド, 以下MNAHと略す)のHOMOおよびLUMOのエネルギー準位の計算結果をTable 5.2に示した。Table 5.2には緩衝溶液(pH7.0)中でのそれぞれの電子移動メディエーター(電子移動メディエーターを表す各番号は, Fig. 5.1の番号と同一)の式量レドックス電位と, NADH酸化反応速度定数(測定法は, Fig. 5.1のキャプションにまとめてある。)を付記した。pH7.0での式量レドックス電位(E^0)は, Ag/AgCl, KCl(飽和)の基準電極からの電位で示した。

Fig. 5.2には, 電子移動メディエーターのHOMOのエネルギー準位と E^0 との関係を示す。Fig. 5.3には, 電子移動メディエーターのLUMOのエネルギー準位と E^0 との関係を示す。*o*-キノン(□)のLUMOのエネルギー準位は, $-1.6 \sim -1.4$ eV, *p*-キノン(○)のLUMOのエネルギー準位は $-2.2 \sim -1.6$ eV, フェノサフラニン色素誘導体(●)のLUMOのエネルギー準位は, $-6.2 \sim -5.0$ eVであり, 他方NADHモデル化合物である(MNAH)のHOMOのエネルギー準位は, -8 eVであることがわかった。

フロンティア軌道理論[125],[126](Fig. 5.4)の軌道相互作用の原理によれば, 電荷は, HOMO(最高被占軌道)の高い分子からLUMO(最低空軌道)の低い分子へ移動する。この場合, HOMO側の分子を電子供与体(electron donor), LUMO側の分子を電子受容体(electron acceptor)とよぶ。NADHと色素の電子移動反応においては, NADHが電子供与体であり, 色素分子が電子受容体である。電子供与体と電子受容体の軌道相互作用のうち, 閉殻分子どうしの相互作用で安定化をもたらすのは, 被占軌道と空軌道の相互作用である。エネルギー差の最も小さい軌道対ほど相互作用は強く, 安定化も大きいことが知られているから, HOMOとLUMOの相互作用がもっとも重要になる。異なる分子間の反応であれば, 2つの分子の間でHOMOとLUMOのエネルギーがそれぞれ違うから, どちらか一方のHOMO-LUMO相互作用が優先する。Fig. 5.4に示すように, 軌道相互作用の結果得られる安定化エネルギーは, 以下のように近似的に表される[127],[126]。

$$\Delta E = \frac{(h_{i,k})^2}{(\epsilon_i - \epsilon_k)} \quad (5.1)$$

ここで, $(h_{i,k})^2$ は, 相互作用を表す積分であり近似的に相互作用する分子軌道同士の重なり積分と比例すると考えてよい[127],[126]ことが知られている。軌道相互作用による安定化がより大きくなるためには,

$$(h_{i,k})^2 \text{がゼロでなく, かつ大きいこと} \quad (5.2)$$

Table 5.2. Energy levels of HOMO, LUMO and E^o' of selected oxidants and the second order rate constants for NADH oxidation.

Oxidants	ϵ_{HOMO} /eV	ϵ_{LUMO} /eV	E^o'/V <i>vs. Ag/AgCl</i>	$k/(\text{Ms})^{-1}$	Ref.
1	-11.49369	-5.20593	-0.51	4.7×10^2	this work
2	-11.57393	-5.21652	-0.48	1.3×10^2	this work
3	-11.29774	-5.01256	-0.47	2.3×10^2	this work
4	-11.32657	-5.04762	-0.46	3.4×10^2	this work
5	-11.28413	-5.07953	-0.43	2.6×10^2	this work
6	-10.4495	-5.45042	-0.32	1.4×10^3	this work
7	-13.03588	-6.16749	-0.115	2.6×10^3	this work
8	-13.00109	-6.11491	-0.165	4.6×10^3	this work
9	-11.81485	-6.03661	-0.1852	2.3	[68]
10	-14.58332	-5.66707	-0.1622	5.5	[68]
11	-11.60497	-5.78926	-0.1322	1.8×10^3	[68]
12	-8.76691	-1.80250	-0.160	1.1×10^3	[71]
13	-10.86444	-5.88302	-0.135	3.0×10^4	[116]
14	-11.73647	-5.75819	-0.130	2.7×10^4	[116]
15	-9.54148	-2.16983	-0.416	0.75	[121]
16	-8.99993	-2.15161	-0.18	2600	[122],[123]
17	-9.43753	-1.39727	-0.176	0.9	[51]
18	-9.76728	-1.49814	-0.056	20	[51]
19	-6.48142	1.45059	0.019	3.3×10^2	[51]
20	-10.13364	-1.57621	0.124	3.3×10^3	[124]
21	-9.83821	-1.93581	0.144	2.1×10^3	[51]
22	-9.80364	-1.61272	0.174	3.6×10^4	[124]
23	-9.95470	-1.59291	0.214	7.7×10^4	[124]
24	-10.78699	-1.65147	0.014	0.5	[124]
25	-10.92096	-1.70612	0.074	2.5	[124]
26	-10.24298	-1.85618	0.114	12	[124]
27	-11.05431	-2.07762	0.174	1.1×10^2	[124]
28	-11.33761	-2.22925	0.194	2.0×10^2	[124]
30	-4.27639	1.69445	0.014	0.9	[124]
31	-9.57729	-3.06694	0.164	6.5×10^2	[124]
32 (MNAH)	-7.98199	0.11143	-0.515	-	

$$|(\epsilon_i - \epsilon_k)| \text{ が小さいこと} \quad (5.3)$$

が必要である。

同一骨格の化合物を比較する場合には、式(5.1)の分母である $(\epsilon_i - \epsilon_k)$ の絶対値が主に軌道の安定化に寄与する。なぜなら、分子の「電子供与体、電子受容体の軌道の重なり積分」がほぼ一定であるため、式(5.1)の分子である $(h_{i,k})^2$ が一定であるとみなせるからである。よって、反応速度定数は、 $|(\epsilon_i - \epsilon_k)|$ に依存する。その例が、Fig.5.5である。

計算結果から、キノン系列のLUMOのエネルギー準位は $-1 \sim -2$ eV、色素のLUMOのエネルギー準位は $-5 \sim -6$ eV、そしてNADHモデル化合物(MNAH)のHOMOのエネルギー準位は -8 eVであることが明らかになった。NADHモデル化合物のHOMOのエネルギー準位とのエネルギー差を見ると、キノン化合物($|(\epsilon_i - \epsilon_k)| = 6 \sim 7$ eV)よりも、アジン色素系列($|(\epsilon_i - \epsilon_k)| = 2 \sim 3$ eV)の方が小さいことがわかる。このことにより、キノン系列のLUMOよりもアジン色素系列のLUMOの方が、NADHモデル化合物のHOMOとの相互作用が起りやすく、電荷移動の確率が高まり、結果としてアジン色素系列の方が反応速度定数が大きくなる、と考えることができる。

このように、アジン色素がキノンと比べてNADH酸化の反応速度定数が大きいことが、式量レドックス電位などではなくLUMOのエネルギー準位から初めて合理的に説明できた。これまではNADHの酸化剤として適当な物質が経験的に探されてきたのだけれども、電子移動メディエーターの設計の新しい視点として、分子軌道計算を採用することは強力な武器になることがわかった。

5.3.3 電子移動メディエーターのLUMOのエネルギー準位とNADH酸化反応速度定数との関係

5.3.3.1 o-キノン系列

Fig. 5.5の17 - 23には、o-キノン系列の電子移動メディエーターのLUMOのエネルギー準位と反応速度定数との関係を示す。LUMOのエネルギー準位が低くなるにつれて、 k が増大している。これは、LUMOのエネルギー準位が低くなるに従い、 $|(\epsilon_i - \epsilon_k)|$ の値が小さくなり、キノンのLUMOがNADHモデル化合物のHOMOと相互作用しやすくなった結果である。

このプロットでは、19と21を除外している。その理由は、19の SO_3^- 基が第3周期の元素である硫黄を含み、また21が第3周期の元素である塩素を含むからである。MNDO-PM3法、MNDO-AM1法が使用するハミルトニアン

では, 2s, 2p 軌道だけを使って計算しており, 第3周期の 3s, 3p, 3d 軌道を直接計算することができないことが知られている [118]。スルホン酸基, ハロゲン基を持つこれらの分子についてもきちんと計算するためには, さらに確度, 精度の高い計算法 (非経験的分子軌道法) を選択する必要がある。

5.3.3.2 *p*-キノン系列

Fig. 5.5の 24 - 28 には, *p*-キノン系列の電子移動メディエーターの LUMO のエネルギー準位と反応速度定数との関係を示す。*p*-キノン系列でも同様に, LUMO のエネルギー準位が低くなるにつれて, k が増大している。これは, LUMO のエネルギー準位が低くなるに従い, $|(\epsilon_i - \epsilon_k)|$ の値が小さくなり, キノンの LUMO が NADH モデル化合物の HOMO と相互作用しやすくなった結果である。ここで Fig. 5.5 より, (□) *o*-キノン 17 - 23 の LUMO のエネルギー準位の値 (-1.6 ~ -1.4 eV) と (○) *p*-キノン 24 - 28 のそれ (-2.2 ~ -1.6 eV) を比較すると, 全体として *p*-キノンの LUMO のエネルギー準位が低いことがわかる。他方, 反応速度定数は, *o*-キノンの方が大きい。LUMO のエネルギー準位がほぼ同じである 22 (4-アミノエチル-*o*-ベンゾキノ, LUMO = -1.61272 eV) と 24 (2-メチル-*p*-ベンゾキノ, LUMO = -1.65147 eV) を比較してみると, 反応速度定数の比は, Table.5.2 より, $(k_{22}/k_{24}) = (36000/0.5) = 7.2 \times 10^4$ である。この例は, 式 5.1 から期待される傾向「LUMO のエネルギー準位が低くなり, NADH モデル化合物 (MNAH) の HOMO のエネルギー準位に近づく, すなわち $|(\epsilon_i - \epsilon_k)|$ の値が小さくなるにつれて k が増大する。」という傾向と一見矛盾している。すなわちこの逆転現象は, 「電子移動メディエーターの LUMO のエネルギー準位を NADH モデル化合物の HOMO のエネルギー準位へ近づけるように低くすることだけが反応速度定数を増大させる」と考えると説明できない。しかしながら, このことは相互作用する分子の軌道の位相の相違を考慮すると以下のように矛盾無く説明できる。

o-キノンと *p*-キノンの LUMO の分子軌道を図示したのが, Fig. 5.6 である。ここでは, 分子の骨格平面 (紙面に平行) から 0.4 Å 上の平行な平面で切った LUMO の断面図 (π 軌道) を等値等高線で表している。実線と波線は, それぞれ軌道の位相の正の部分あるいは負の部分を表す。地図の等高線と同様, 等値等高線の間隔が混んでいる部分ほど, 山が高いすなわち軌道関数の密度が大きいことを表す。単位は (a.u.)^{-3/2} である。ただし a.u. は長さの原子単位であり, ボーア半径

$$1 \text{ a.u.} = 0.5292 \text{ \AA} = \frac{4\pi\epsilon_0(\frac{h}{2\pi})^2}{m_e e^2} \quad (5.4)$$

で表される。ただし、 ϵ_0 は真空の誘電率、 h はプランク定数、 m_e は電子の静止質量、 e は電気素量である。したがって体積は a.u.^3 で表されるから、単位体積あたりの電子の個数つまり電子密度関数 ψ^2 は a.u.^{-3} の単位をもち、結果として軌道 ψ は $\text{au}^{-3/2}$ の単位で表される。等高線の刻み幅は、Fig.5.6の17では $0.010262(\text{a.u.})^{-3/2}$ である。プログラムの仕様としてこの刻み幅そのものは表示条件によって各々異なるので、他の図については刻み幅を省略することにする。

Fig.5.6の実線と波線が、それぞれ軌道の位相の正の部分あるいは負の部分を表すので、キノンの酸素原子に注目すると、*o*-キノンでは2つの酸素原子上の分子軌道(LUMO)はそれぞれ同位相であることがわかる。一方*p*-キノンの酸素原子上の分子軌道(LUMO)はそれぞれ逆位相であることがわかる。キノンの酸素原子は、NADHおよびNADHモデル化合物からの電子またはヒドリド(H^-)のアクセプターサイトであることが報告されており[33],[29],[27],[128]、($1e^-$, 1H^+ , $1e^-$)の3段階移動であるのか、 H^- の直接移動であるのかは、系によって異なることがわかっている。従って、Fig. 5.7に模式的に示すように、電子または H^- を受け止める「手」が、位相の異なるパラ位に2本あるよりも、同位相の状態でオルト位に2本ある方が受け止める確率が大いと考えたと以上の事が説明できる。つまり、「*o*-キノンの反応速度定数が*p*-キノンのそれよりも2桁大きいこと」は、*o*-キノンの2つの酸素原子上の分子軌道が同位相で、*p*-キノンのそれは逆位相であることに密接に関係していると考えられる。よって、このような分子軌道の図示(この場合はLUMOの等高線図)は、電子移動メディエーターの反応特性を説明する上で有力であることがわかった。

5.3.3.3 フェノキサジン系列

本研究のフェノサフラニン系列およびキノン以外の電子移動メディエーターについては、研究例が少なく系統的な解釈を行なうことは困難であった。またフェノチアジン色素は、第3周期の元素である硫黄を含むので、キノンの項で述べたように計算法に限界があるため解釈が困難である。

一方、Fig. 5.8に示すようにフェノキサジン系列の電子移動メディエーターのLUMOのエネルギー準位と反応速度定数との関係を見ると、キノンと同様の傾向が見られた。すなわちLUMOのエネルギー準位が低くなるにつれて、 k が増大している。これは、LUMOが低くなるに従い、 $|\epsilon_i - \epsilon_k|$ が小さくなり、フェノキサジン色素のLUMOがNADH類縁体のHOMOと相互作用しやすくなった結果であると考えられることができる。

5.3.3.4 フェノサフラニン(アルキルフェナジニウム)系列

Fig. 5.9には、フェノサフラニン系列の電子移動メディエーターのLUMOのエネルギー準位と反応速度定数($k_{1([NADH]=0)}$)との関係を示す。この一連のフェノサフラニン系列においては、LUMOのエネルギー準位が低くなるにつれて、 k が増大していることがわかる。これは、LUMOのエネルギー準位が低くなるに従い、 $|\epsilon_i - \epsilon_k|$ が小さくなり、フェノサフラニン色素のLUMOがNADH類縁体のHOMOと相互作用しやすくなった結果である。この結果は、フェノサフラニンの分子骨格の修飾により、そのLUMOのエネルギー準位を下げることを表し、NADH酸化反応の反応速度定数が大きい色素を設計する指針も与える。

第1章で述べたように本研究では、フラビン補酵素(FAD)と化学構造が類似していることも考慮してフェノサフラニン色素をとりあげた。しかしながら、フラビン類のLUMOのエネルギー準位は、 -2.2 eV(Table 5.2, 15および16)であり、フェノサフラニン色素のLUMOのエネルギー準位 $-6.0 \sim -5.0$ eVとはエネルギー準位が大きく異なっていることがわかった(Table 5.2およびFig. 5.9)。化学構造より2つの分子の類似性を期待したが、分子軌道計算の結果、フェノサフラニンとフラビンとではアクセプターとしての性質が顕著に異なることがわかった。すなわち、フェノサフラニンの方がアクセプターとして優れていることが明らかとなった。

5.3.3.5 速度論的パラメーター($k_{1([NADH]=0)}$, k_{+2} および K_M)の解釈

第4章で、フェノサフラニン色素修飾電極がNADHと中間体を經由しながら電子移動するという機構で解析を行なったが、中間体が形成しやすい理由として、以上述べてきた軌道相互作用を考え合わせることができる。

Gortonら[103]は、フェノキサジン色素(Nile blue A)とNADHとの電荷移動錯体の形成を、SERS(表面増強ラマン散乱)を用いて確かめている。福住ら[33]は、*p*-キノンである

-クロラニル(chloroanil)(テトラクロロ-*p*-ベンゾキノン)がNADHモデル化合物であるN-ベンジルニコチンアミドと電荷移動錯体を形成することを報告している。前節までにわかったとおり、アジン色素のLUMOのエネルギー準位よりも高いLUMOのエネルギー準位を持つ

-キノンとでさえ、NADHモデル化合物は電荷移動錯体を形成するのであるから、フェノサフラニンとNADHとでもまた2分子は相互作用をして中間体を形成すると考えられる。そこでストップトフロー・ラピッドスキャン分光法で同様の電荷移動錯体の検出を試みた。福住らの系では彼らの観測を再現できたが、

フェノサフラニンとN-ベンジルニコチンアミドの系では、電荷移動錯体に帰属される明瞭な新しいピークを観察できなかった。これは、電荷移動錯体のモル吸光係数が小さいことによると考えた。

第4章で求めた速度論的パラメーター(k_{+2} および K_M)を、LUMOのエネルギー準位に対してプロットしたのがFig. 5.10である(1 - 8はフェノサフラニン誘導体, 11はフェノチアジン誘導体であるチオニン, 12はフェノキサジン誘導体であるMeldola's blue, 14はフェノキサジン誘導体であるMeldola's blue, 12, 14は文献値。1 - 8, 11, 12, それぞれの酸化体はカチオンである。一方14の酸化体は、電氣的に中性である。)。LUMOのエネルギー準位が低くなり、NADHモデル化合物のHOMOのエネルギー準位(-8 eV)との差(すなわち、Fig.5.4の $|\epsilon_i - \epsilon_k|$ の値)が小さくなるにつれて、 $\log(k_{+2})$ の値は増大する傾向があることがわかった。他方、 $\log(K_M)$ の値は、フェノサフラニン誘導体1 - 8, フェノチアジン誘導体であるチオニン11, フェノキサジン誘導体であるMeldola's blue14, でほぼ同じオーダーであるとみなすことができた。

第4章で、「迅速平衡が成り立つ条件、すなわち $k_{+1}, k_{-1} \gg k_{+2}$ であれば、 K_M は、中間体の解離定数 K_S とほぼ同じであるとみなすことができる。」と述べた。Fig.5.10のLUMOへの依存性($\log(K_M)$ の値が、フェノサフラニン誘導体1 - 8, フェノチアジン誘導体であるチオニン11, フェノキサジン誘導体であるMeldola's blue14, でほぼ同じオーダーであること)をみると、このことは色素とNADHが作る中間体の形成し易さ $K_S(\approx K_M)$ が化学構造や荷電によって決まりほぼ一定であることに対応する。 $\log K_M$ の値が小さい(10^{-4} Mのオーダー)ことは、色素がNADHを捕まえる能力が大きいことに対応し、 $\log K_M$ の値が大きいことは、色素がNADHを捕まえる能力が小さいことに対応すると考えられる。つまり、 $\log K_M$ の値が大きいと、その後の電子移動反応の速度も小さいという関係が期待される。12(Fig. 5.10で、LUMOが-1.80 eV)は、フェノキサジン骨格をもつ1,2-ベンゾフェノキサジン-7-オンである。この物質の酸化体は電荷を持っておらず、LUMOの値が1 - 8, 11, 14と著しく異なる。このことによりNADHとの中間体の形成し易さが異なり、結果として k_{+2} が比較的小さくなっていることがわかる。すなわち、1 - 8, 11, 14は、LUMOのエネルギー準位が低いいため中間体を形成し易く、 $\log K_M$ の値が(10^{-4} Mのオーダー)と小さくなり、結果として k_{+2} の値が増大し、そのことが、全体の反応速度定数 $k_1([\text{NADH}] = 0)$ を増大させることにつながることがわかった。

5.3.3.6 キノン, 色素, NADHモデル化合物の接近しやすさの定量化

以上までの節で, NADHの酸化に関してより大きい反応速度定数を持つような酸化剤, 電子移動メディエーターの必要条件は,

- (1) 電子供与体のHOMOのエネルギー準位と電子受容体のLUMOのエネルギー準位の差が小さくなること,
 - (2) 電荷移動する部位の分子軌道の位相がそれぞれ同じであること,
- であった。以上のことは, 式(5.1)から期待されるとおりである。

上記の(2)に対応するが, 電子供与体のHOMOのオービタルと電子受容体のLUMOのオービタル同士の重なりが電子移動の必須条件であるので, 2分子の近より方もまた反応速度定数に影響を及ぼすはずである。そこで, 電子供与体の π 軌道と電子受容体の π 軌道が相互作用することを仮定して2分子を近づけて配置し, どのような配向が最も安定になるのか, どのような構造を有する電子移動メディエーターだと最も安定な中間体を形成するのかを, 試みに計算してみた。

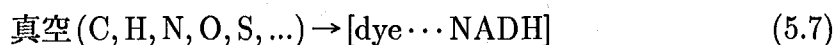
「2分子の接近しやすさ, 接近しにくさ」の指標として, 「化学的正確さ」が高いと実証されているMNDO-PM3法の生成熱[120]を用いた。各構成原子からそれぞれの分子を生成する反応の生成熱が計算されるので, 以下のような生成熱を計算させて, 接近しやすさを評価した。



式(5.5)で表される色素の生成反応の生成熱を ΔH_1 とする。



式(5.6)で表されるNADHモデル化合物の生成反応の生成熱を ΔH_2 とする。



式(5.7)で表される2分子のコンプレックス(詳細は後述)の生成反応の生成熱を ΔH_3 とする。

ΔH_1 および ΔH_2 の値を得るためには, それぞれの分子を単独に計算すると得られる。 ΔH_3 の値を得るためには, Fig.5.11に示すような内部座標を使ってコンプレックスの構造を仮定し, 2分子を一定距離に平行に配置し, ダミー原子をFig.5.11のように置いて2分子をつなぎ, あたかも1分子であるように計算する[119]。

筆者が「2分子の接近しやすさ」の指標としたのは,



式(5.8)で表されるコンプレックスの生成反応の生成熱 $\Delta H_{\text{complex}}$ である。式で表すと、

$$\Delta H_{\text{complex}} = \Delta H_3 - (\Delta H_1 + \Delta H_2) \quad (5.9)$$

である。式(5.8)で表される $\Delta H_{\text{complex}}$ が負の値であり、かつ極小値をとるような配向が2分子の最適な配向であると考えられる。

計算の際に以下のような研究例を参考とした。インドールとNAD⁺との間で形成される電荷移動錯体の解釈として、Fig.5.11と同様に2分子を平面に平行に配置してPPP(Parr Pariser Pople)計算を行なうことにより、永田[129]がこの系の解釈に成功している。NADHとFAD(フラビンアデニンジヌクレオチド)の間で形成される電荷移動錯体の解釈として、2分子を平面に平行に配置したような電荷移動錯体が存在することを推定している報告がある[130]。このような研究例を参考にして、独自の内部座標を作製した。Fig. 5.11に示すように、コンプレックスとして、色素の分子平面とNADHの分子平面を平行に向かい合わせるような配置をとらせた。1-13で示す黒丸(●)がダミー原子である。このようなダミー原子の配置をした理由は、Fig. 5.11のNADH分子の方を回転させて、各角度で生成熱を計算させることを念頭に置いたからである[131]。

2分子間の距離は、以下の文献を参考にした。インドールとNAD⁺(NADHの酸化体)の電荷移動錯体の電荷移動吸収波長の実験結果を説明する報告[129]では、インドールとNAD⁺のvan der Waals半径を考えて、3.4Å離れた距離に配置している。その報告では、本研究と同様に2分子を平行に配置して垂直に横切る軸に関して分子を回転させて計算させている。そこで本研究では、インドールとフェナジンメトサルフェートの構造が類似しているので、フェナジンメトサルフェートとNADHモデル化合物との距離を3.4 Åとした。

キンヒドロロン[132]の α 型(単結晶系)[133]、 β 型(三斜晶系)[134]の両方の結晶中、*p*-ベンゾキノンとヒドロキノンの分子は、典型的な電荷移動力により上下に積み重なって(重心はずれているが、)シートをつくっており、シート内の分子面はすべてほぼ平行であり、距離3.2Åにあることが知られている。よって比較計算のキンヒドロロンの計算は、距離3.2Åを用いた。

まずキンヒドロロンの距離を6.2ÅとしてFig. 5.12のように10度ずつ17個角度を変えて計算させた結果(ΔH_3)をFig.5.13に示した。

$$\begin{aligned} \Delta H_{\text{complex}} &= \Delta H_3 - (\Delta H_1 + \Delta H_2) \\ &= -55.92 - (-31.55 - 66.06) \\ &= +41.69 \text{kcal/mol} \end{aligned}$$

となり、 $\Delta H_{\text{complex}} > 0$ より吸熱反応であることがわかった。

フェノサフラニンの類縁体であるPMS(フェナジンメトサルフェート)とNADHモデル化合物(MNAH, 1,4-ジヒドロ-N-メチルニコチンアミド)の距離を6.2Åとして平面で向かい合わせて、Fig. 5.12のように10度ずつ17個角度を変えて計算させた結果(ΔH_3)が、Fig. 5.14である。角度を変化させると、生成熱に極大があった。よって配向が重要であることは示唆された。しかしながら、 $\Delta H_{\text{complex}}$ が正の値を持つ($\Delta H_{\text{complex}} > 0$)ので、反応が吸熱的であることがわかった。すなわち、エネルギーを与えないとこのような配向をしないことがわかった。

キンヒドロンの距離を3.2Åとして同様に ΔH_3 を計算したのが、Fig. 5.15である。同様に $\Delta H_{\text{complex}} > 0$ より吸熱反応であることがわかった。

PMSとNADHモデル化合物の距離を3.4Åとした結果をFig. 5.16に示した。o-ベンゾキノンとNADHモデル化合物の距離を3.4Åとして同様に ΔH_3 を計算したのが、Fig. 5.17である。p-ベンゾキノンとNADHモデル化合物の距離を3.4Åとして同様に ΔH_3 を計算したのが、Fig. 5.18である。同様に正の値を持ち($\Delta H_{\text{complex}} > 0$)、吸熱反応であることがわかった。

2分子を平行に配置して2分子を回転させて生成熱が負で、極小をもつような配向を探した。平行配置のまま、2分子の距離を6.2Åから3.4Åへと近づけると、仮定したコンプレックスの生成熱は依然として正で($\Delta H_{\text{complex}} > 0$)、また近づけることによってその生成熱は増大した。この結果から、本研究のフェノサフラニン色素とNADHの相互作用による中間体は、例えばNAD⁺とインドールの間の電荷移動錯体に関して従来説明されているような π 軌道同士の相互作用に基づいた中間体ではないことが示唆された。すなわち、平行配置で近づいた場合に、2分子の原子核同士の反発が無視できない。よって原子核同士の反発が最も小さい近づき方をするほうがより生成熱が小さいことが考えられる。これをより詳しく検討するためには、非経験的分子軌道法(*ab initio*計算)[135]を使って解明する必要がある。

5.4 結論

一連の電子移動メディエーター系列においては、 k と E^o 、 k とLUMOのエネルギー準位に相関関係が見い出された。同じ E^o を持つようなアジン色素とキノンを比較すると、アジン色素の方が k が大きく、これはアジン色素のLUMOのエネルギー準位がより低いことによることがわかった。電子移動メディエーターの分子設計においては、電子移動メディエーターのLUMOのエネルギー

準位を下げるだけでなく、さらに電子移動メディエーターとNADHとの分子軌道の位相の重なりをも考慮する必要がある。*o*-キノンと*p*-キノンによるNADH酸化反応速度定数の差異の説明は、この位相の重なりを初めて説明が可能になった。以上のように、NADH酸化の電子移動メディエーターの設計の新しい指針として、分子軌道計算が強力な武器になることが明らかとなった。

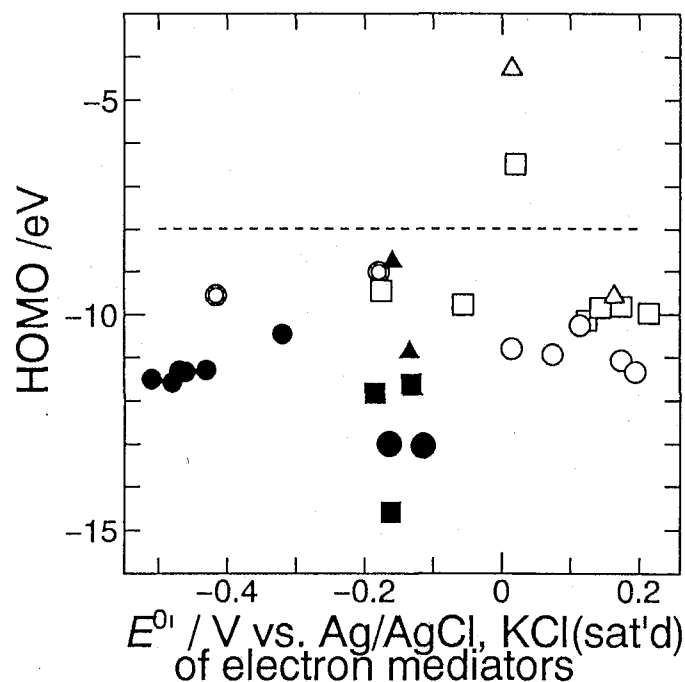


Fig. 5.2. Energy levels of HOMO *vs.* $E^{o'}$ of the mediators in phosphate buffer solution (pH 7.0). adsorbed mediator: $\Gamma = 2 \sim 5 \times 10^{-10}$ mol cm^{-2} ; ●: phenazines (1,2,3,4,5,6,7,8), this work; ■: phenothiazines (9,10,11); ▲: phenoxazines (12,13,14); ⊙: flavins (15,16); □: *o*-quinones (17,18,19,20,21,22,23); ○: *p*-quinones (24,25,26,27,28); △: indophenol (30) and TCNQ (31). The dashed line represents HOMO of NADH model compound (MNAH, 1,4-dihydro-N-methylnicotinamide). Symbols are the same as those in Fig.5.1.

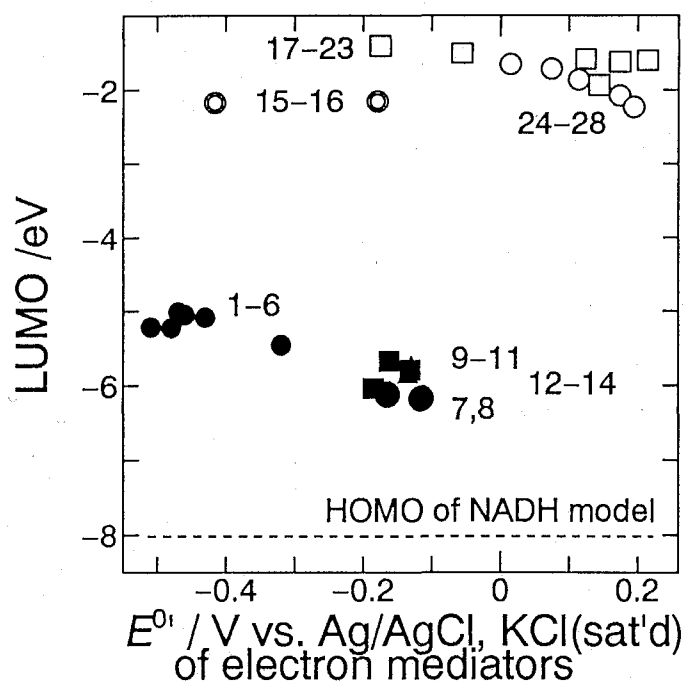


Fig. 5.3. LUMO *vs.* $E^{o'}$ of the mediators in phosphate buffer solution (pH 7.0). Symbols are the same as those in Fig.5.2.

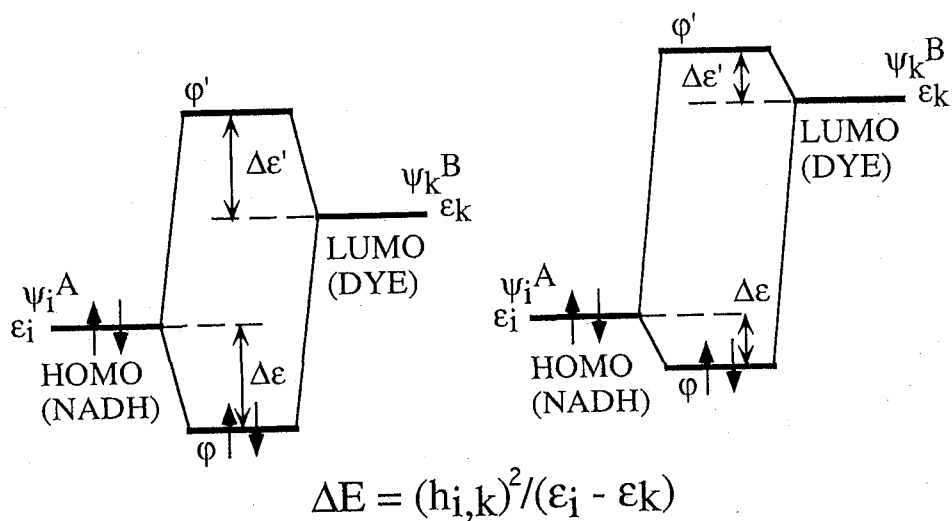


Fig. 5.4. Splitting of molecular orbitals by a HOMO-LUMO interaction.

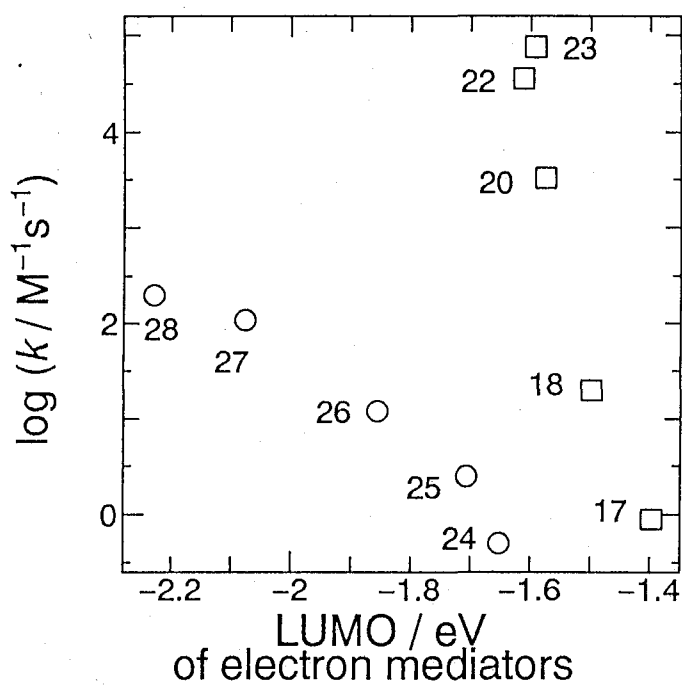


Fig. 5.5. Rate constants for the oxidation of NADH *vs.* energy levels of LUMO of (□) *o*-quinones and (○) *p*-quinones.

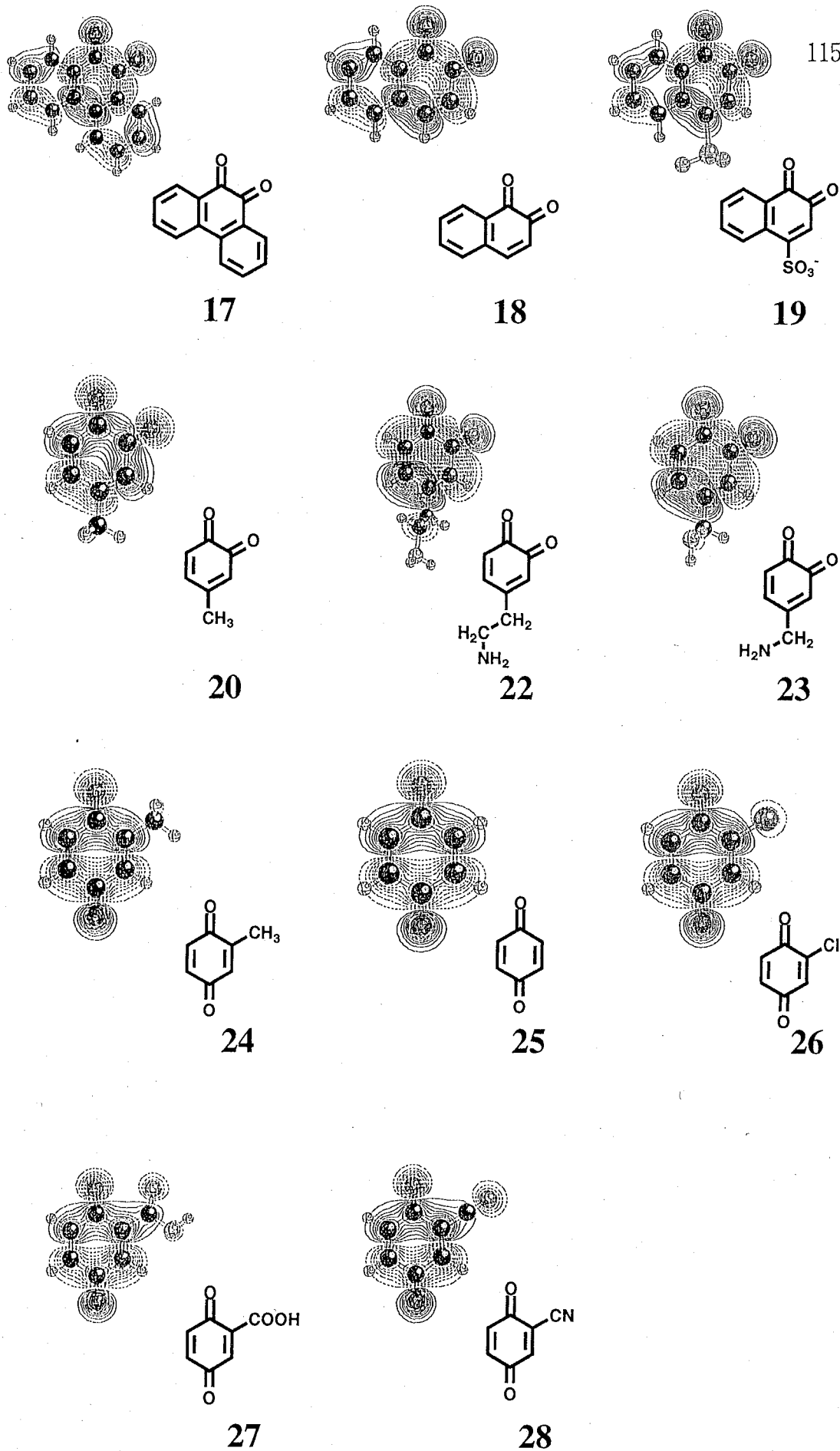


Fig. 5.6. Contour maps of LUMO of *o*-quinones and *p*-quinones. Solid and broken lines represent "plus" and "minus", respectively, of the phase of molecular orbitals.

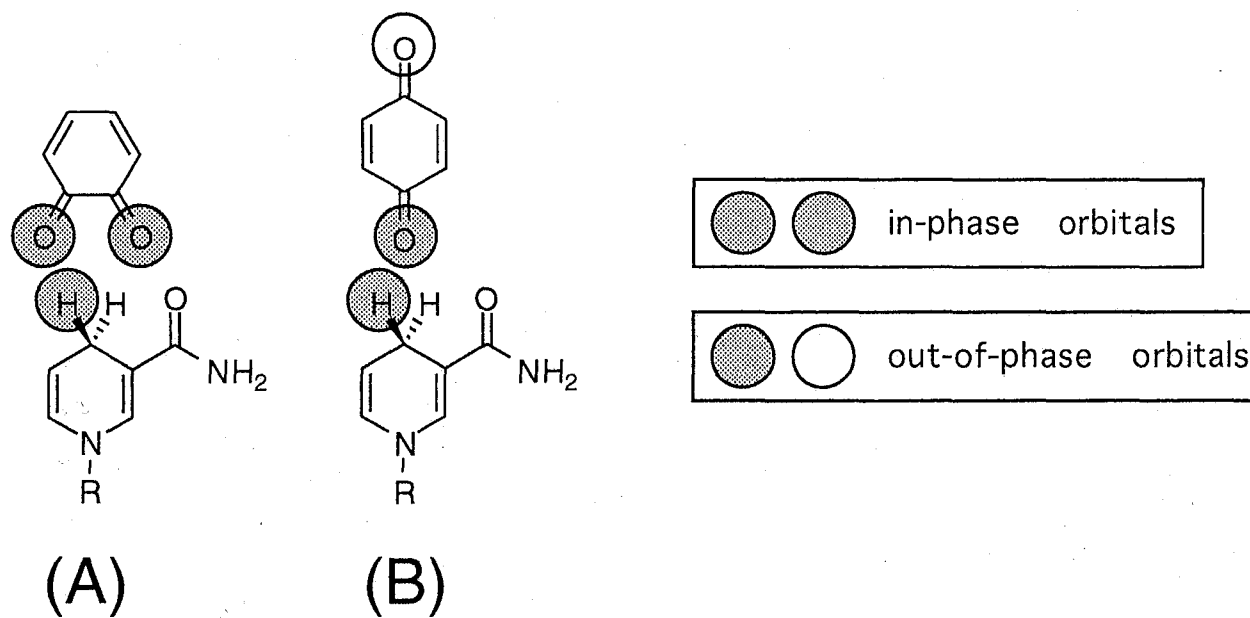


Fig. 5.7. In-phase and out-of-phase orbitals of *o*-quinone, *p*-quinone and NADH.

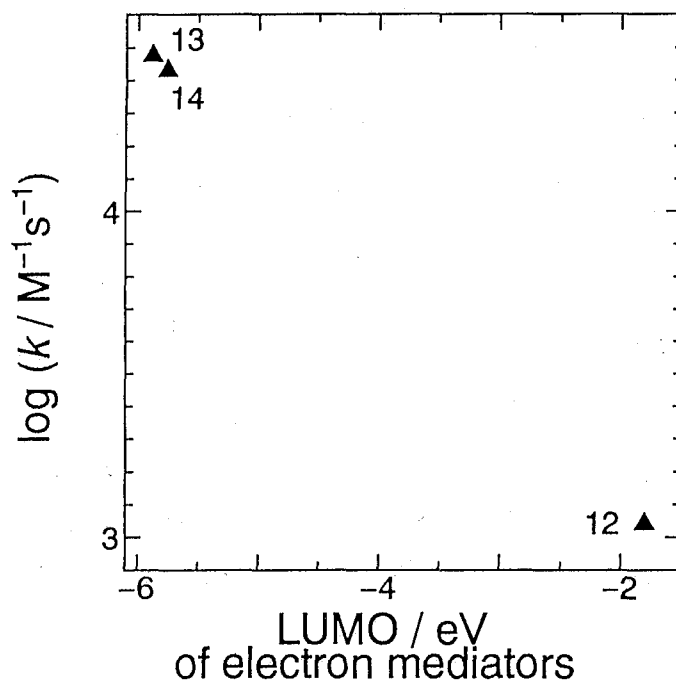


Fig. 5.8. Rate constants for the oxidation of NADH *vs.* energy levels of LUMO of phenoxazines.

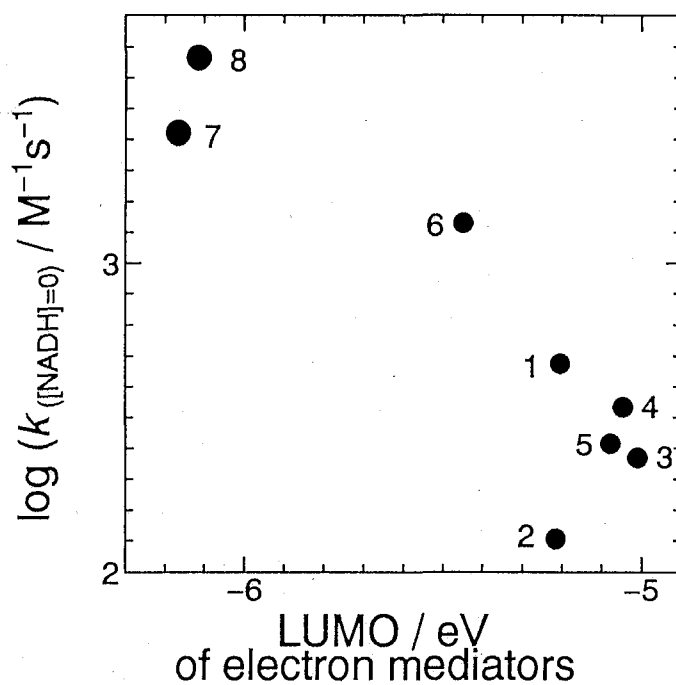


Fig. 5.9. Rate constants for the oxidation of NADH *vs.* energy levels of LUMO of phenazines.

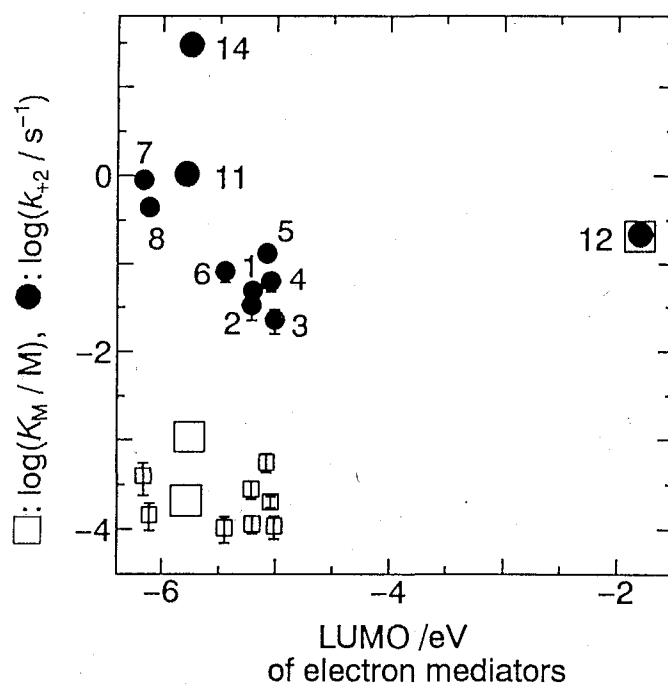


Fig. 5.10. Kinetic parameters (k_{+2} and K_M) for oxidation of NADH *vs.* energy levels of LUMO of phenosafranine derivatives.

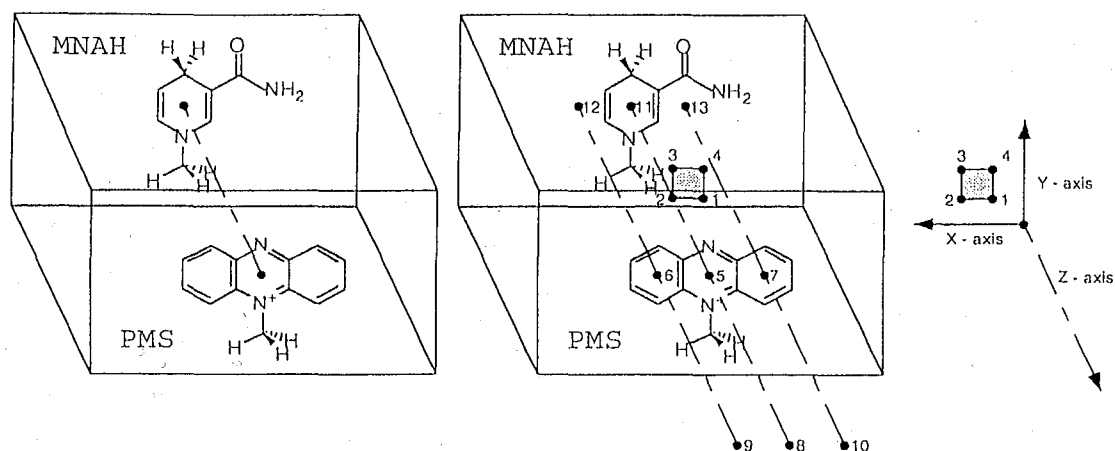


Fig. 5.11. A configuration of dummy atoms (● : No.1 - 13) that specify a configuration of a PMS (Phenazine methosulfate) and an NADH model compound (MNAH, 1,4-dihydro-N-methylnicotinamide) in a MO (Molecular Orbitals) calculation.

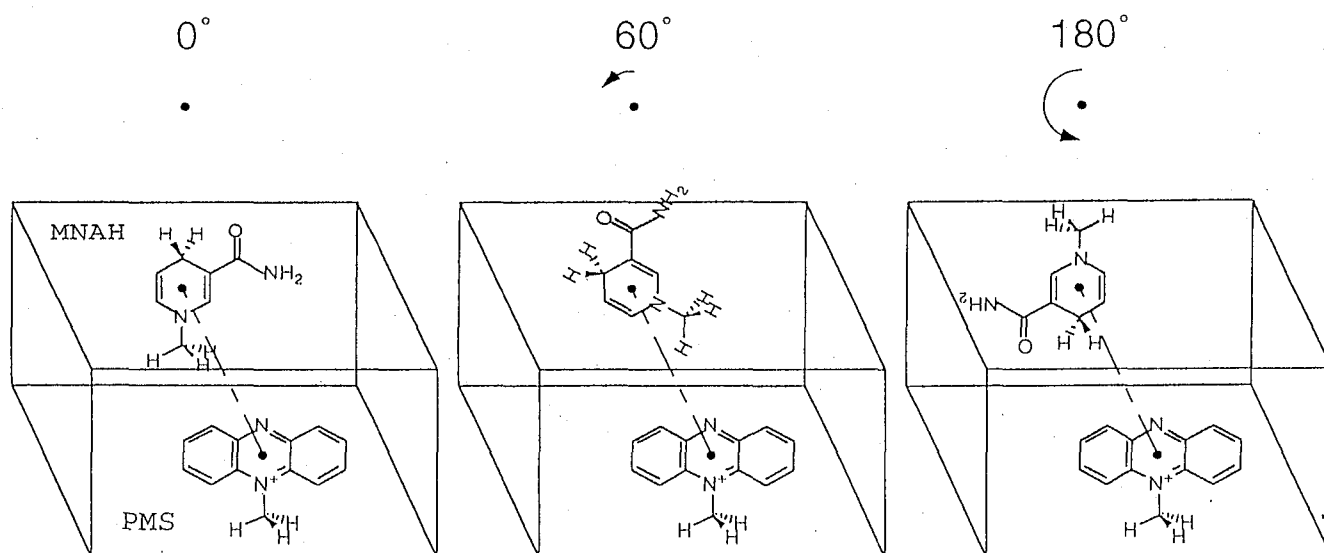


Fig. 5.12. A configuration of PMS and MNAH, where 2 molecules are parallel to each other.

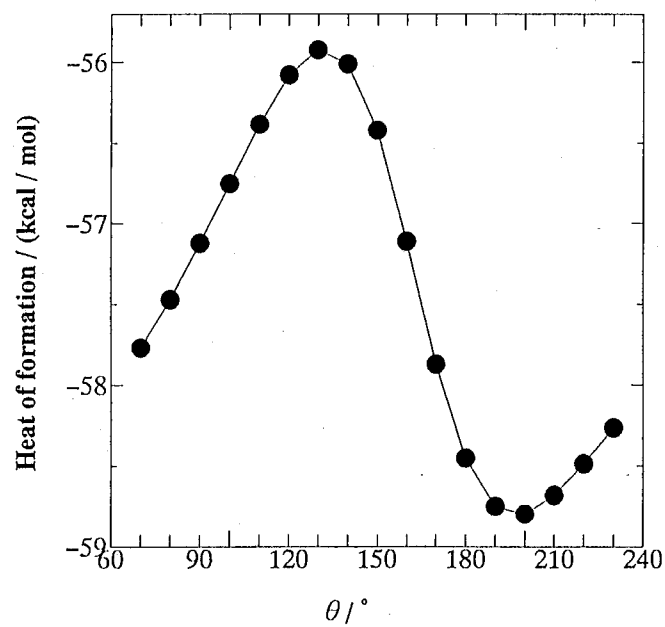


Fig. 5.13. Heat of formation of a complex (6.2 Å apart) vs. the angle of and *p*-benzoquinone and dihydro-*p*-benzoquinone.

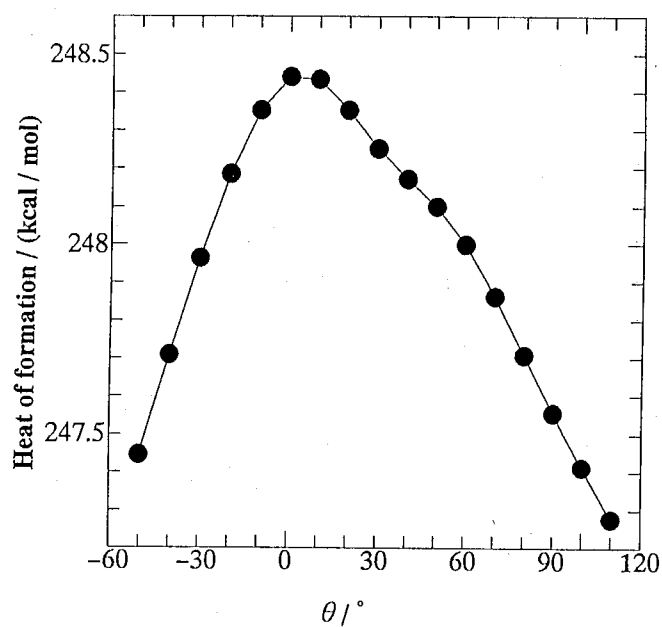


Fig. 5.14. Heat of formation of a complex (6.2 Å apart) vs. the angle of PMS and MNAH.

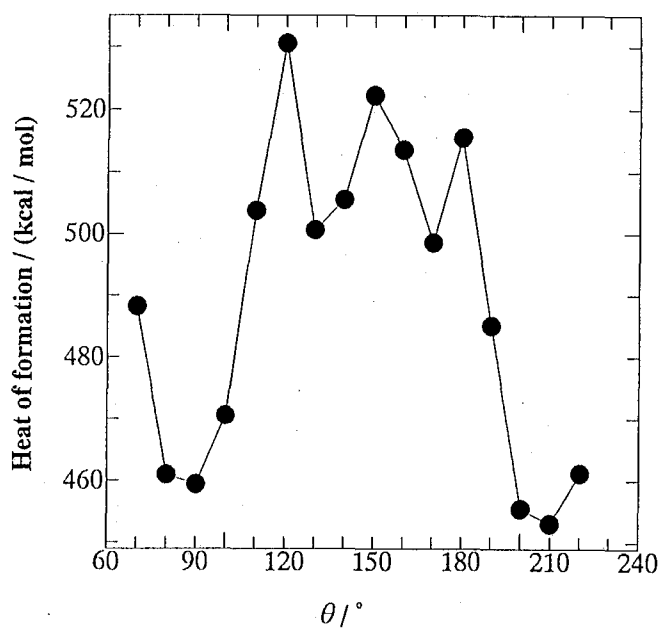


Fig. 5.15. Heat of formation of a complex (3.2 Å apart) *vs.* the angle of *o*-benzoquinone and *p*-benzoquinone.

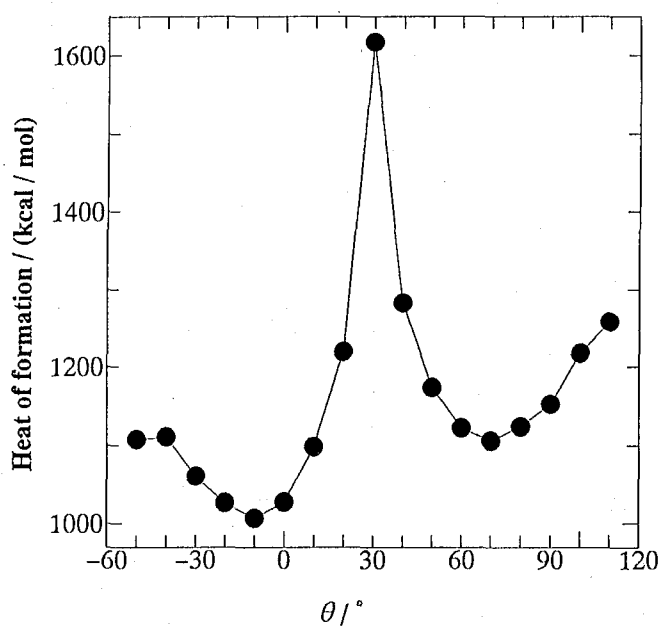


Fig. 5.16. Heat of formation of a complex (3.4 Å apart) *vs.* the angle of PMS and MNAH.

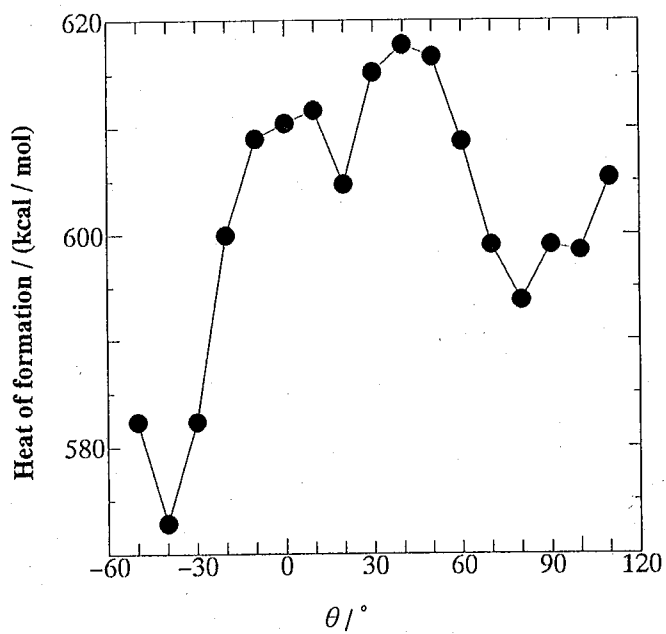


Fig. 5.17. Heat of formation of a complex (6.2 Å apart) vs. the angle of *o*-benzoquinone and MNAH.

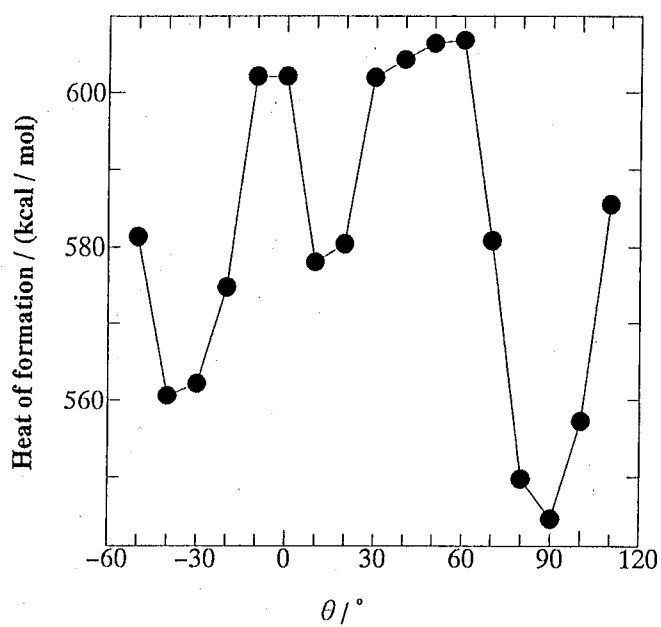


Fig. 5.18. Heat of formation of a complex (6.2 Å apart) vs. the angle of *p*-benzoquinone and MNAH.

第 6 章

アジン色素修飾電極の NADH 電気 化学検出器としての応用

6.1 緒言

NADH の分析は、250 種類を越える脱水素酵素が酸化体 NAD^+ を補酵素として必要とする [38] ため、その酵素の基質の濃度を定量するために大変重要である。これまで NADH の分析法は多数提案されており、分光光度法 [136]、蛍光法 [136]、化学発光法 [136]、生物発光法 [38] および電流分析法 [38] などがある。これらの中で、NADH の酸化反応を加速するような様々なレドックス電子移動メディエーターを化学的または物理的に修飾、固定化した電極における NADH の電極触媒酸化に基づく電流分析法が注目されている。なぜならこの方法が、取扱いの容易さ、試料体積の少なさ、自動化されたシステムへの適応性に加え、選択性、確度、精度といったセンサー特性を容易に改良できるからである。これと関連して、メディエーターの 3 次元的な分布を持った高分子修飾電極は、メディエーターを高密度に集積することができる [104] ことから単分子層修飾電極よりも触媒電流密度が大きくなり、それが理由でこれまでさかんに研究されてきている。以上のことは本論文でも第 4 章で、アジン色素修飾電極についてその触媒挙動を明らかにしてきたとおりである。

また、微小電極に修飾したいいわゆる修飾ワイヤー型の高分子修飾電極は、*in vivo* センサーデバイスとして有望である [67],[137],[63]。

本章では、第 2 - 第 5 章で検討した電子移動メディエーターの中で、特に NADH 酸化触媒能に優れ、しかも容易に電極表面に修飾可能な色素としてチオニン、フェノサフラニンを選び、これらの修飾電極を NADH の電気化学的フローインジェクション薄層型検出器へ適用した結果について述べる。チオニ

ン修飾電極については、NADHの酸化反応に対する種々の妨害物質の影響についても検討した。

6.2 実験

6.2.1 試薬および実験装置

L(+)-アスコルビン酸(関東化学株式会社, 特級), ドーパミン塩酸塩(関東化学株式会社, 特級), 尿酸(和光純薬工業株式会社, 特級), および β -NADH(オリエンタル酵母)は, 市販の特級試薬をそのまま用いた。キャリア溶液は0.2 M リン酸緩衝液(pH 7.0)を脱気せずに用いた。

Fig. 6.1にフローインジェクション分析の概念図を示す。フローインジェクション分析の装置は, サンプルインジェクター(SNK Model SVI-6U7(サヌキ工業))[138],[139], ポテンシostatおよび電気化学検出器としての電解セル(LC-4B アンペロメトリック・ディテクター(BAS(Bioanalytical Systems)社)から構成されている。Fig. 6.2に, 用いた薄層型検出器(LC-17A, 流路の厚さ: 50 μ m)の構成図を示す。作用電極としてテフロンブロックに埋め込まれた直径3.0 mmのグラシーカーボン円盤電極(MF-1000, BAS:電極面積: 0.07 cm^2 , 以下GC電極と略す)を用いた。作用電極は, 流路に対してDual Parallel, Dual Seriesの2つの配置の仕方(Fig. 6.2参照)があるが, 本研究では2つの電極が溶液の流れに対して等価な配置となるDual Parallelを採用した。電極は, 粒径1ミクロンのアルミナで研磨し, 超音波洗浄した後, アジン色素を修飾した。対極はステンレス・スチールのブロックで, 基準電極と一体型である。基準電極は3 mol dm^{-3} NaClの銀/塩化銀電極(RE-4, BAS)を用いたが, 前章までの結果と比較できるように, 実験結果はKCl飽和の銀/塩化銀電極に対する電位で示した(0 mV vs. Ag/AgCl, NaCl(3M) = 212 mV vs. NHE, 0 mV vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd) = 197 mV vs. NHEより, 0 mV vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd) = -15 mV vs. Ag/AgCl, NaCl(3M)である)。実験データは, サーボコーダー(SR6342 グラフテック社)を用いて記録した。

6.2.2 修飾電極の作製

第3章と同様, 電位掃引電解によりチオニンおよびフェノサフラニン修飾GC電極を作製した。修飾電極は, 0.2 M リン酸緩衝溶液(pH 7.0)中で, サイクリックボルタンメトリーを行なうことにより修飾電極の酸化還元応答を安定させた後, 薄層型検出器にセットして測定に用いた。

6.2.3 実験条件

フローインジェクション分析は、ポンプでキャリア溶液をアジン色素で修飾した薄層型検出器へ一定流量で送液し、ポンプと薄層型検出器の途中でサンプルインジェクターからサンプルを20 μ l注入することにより行なった。20 μ lの試料溶液をインジェクトした時の電流応答を設定した電位で検出した。特に断らない限り、送液の流速は1.0 ml/minで測定した。送液速度は、装置添付の検量線を用いて制御した。

6.3 結果および考察

6.3.1 チオニン修飾電極によるNADH触媒酸化

6.3.1.1 安定性

Fig. 6.3は、1mM NADHをおよそ5時間にわたって99回連続インジェクションした場合に得られた電流時間曲線である。NADH酸化に対応するピーク電流応答が大きくなること、およびより正の電位で妨害物質の酸化電流応答が大きくなること(詳細は後に述べる)を考慮して、フローインジェクション分析のNADH検出電位は、+0.1 Vとした。得られたピーク電流は、NADH非存在下および存在下で得られた電流の差電流である。ピーク電流値は数十回のインジェクションの間に次第に減少した。しかしながらおよそ70から80回の後、最初のインジェクションの電流値のおよそ40%になりほとんど一定の電流値が得られるようになった。結果としてこのような連続インジェクションは、一定の電流応答を得るためのチオニン修飾電極の“前処理”と見なすことができる。チオニン修飾電極について、このような“前処理”に比べてさらにより遅いタイムスケールの電流応答の時間変化が生じることを観測した。前処理をした電極を0.2 M リン酸緩衝溶液(pH7.0)中、室温で一昼夜放置した場合、チオニンの表面被覆量はほとんど変化しなかったが、電流応答は前処理直後に得られた電流応答の約3分の1に減少した。しかしながらこの電流応答は、さらに1~2時間のフローインジェクション分析を行なう間ほとんど変化しなかった。これらの事実は、チオニン修飾電極が化学的に安定であり、チオニンが電極表面に強固に付着していることを示唆する。また、チオニン修飾電極では電流応答が1日というタイムスケールで変化したが、これは膜のゆっくりとしたモホロジー変化が原因と考えた。

6.3.1.2 典型的な応答

前処理の後、0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH7.0) 中室温で一昼夜保持したチオニン修飾電極での0.1, 0.5, 1.0 mM のNADHに対するフローインジェクション応答をFig. 6.4に示す。再現性の良い応答が得られていることが明らかである。すなわちそれぞれの濃度において、3つの連続インジェクションで得られたピーク電流値にはほとんど差異が無く、それらの相対標準偏差は2%以下であった。さらにこの電極の電流応答速度は比較的大きく、最大電流に達する応答時間は10秒以下であった。このような相対的に速い応答は、動的なフロー系において期待されるように溶液の迅速な補給の結果である。

6.3.1.3 流速依存性

NADH濃度一定での電流応答の流速依存性を、異なる流速においてピーク電流値を測定することにより評価した。このような実験の典型的な例をFig. 6.5に示す。電流応答は流速を増加すると減少することがわかった。例えばピーク電流値は、0.5 ml/min で87 nA から、2.0 ml/min で51 nA まで減少した。またFig. 6.6に示すように、同様の実験での検出電流の積分値は流速を増加すると電流値と同様に減少すること、およびそれぞれの流速でチオニンの表面被覆量 (Fig. 6.6では、 $\Gamma=5.3 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, $\Gamma=3.2 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$) が大きいほど積分値が大きいこともわかった。これらの事実は、サンプルを修飾電極へ接触させる時間を制御する、すなわち流速を変化させることによってNADH酸化の電子メディエートをするレドックス活性サイトへのNADHの拡散(第4章 Fig.4.13の i_s および i_A)が制限されることを示唆している。コバルトテトラキス(*o*-アミノフェニル)ポルフィリン高分子薄膜(内部薄膜)およびグルコースオキシダーゼ酵素薄膜(外部薄膜)の2層薄膜修飾電極に基づく化学修飾GCフローインジェクション検出器によるグルコースの検出[138]においてもまた、同様の流速依存性が報告されている。このような流速依存性は薄膜修飾電極系に特有であり、それに関連する速度論は解明され続けている。

6.3.1.4 検量線

Fig. 6.7は $\Gamma=1.3 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$ のチオニン修飾GC電極で得られたNADH検出の典型的な検量線を示す。このセンサーは、5 μM ~1mMのダイナミックレンジを持つこと、およびNADH濃度に対する電流値の初期勾配で示される感度が30nA/mMであることがわかった。NADHの酸化に対する妨害物質(すなわち、L(+)-アスコルビン酸、尿酸、ドーパミン)の存在下、非存在下に

おけるセンサーの電流応答を Fig. 6.8 に示す。これらの物質が NADH の酸化に対する妨害物質となるのは Fig. 6.9 に示すように未修飾 B P G 電極においては NADH の酸化電位 (およそ 0.65 V) よりも負の電位範囲で酸化されることおよび生体内にはかなりの濃度で存在しうることによる。アスコルビン酸, 尿酸, ドーパミンの濃度はそれぞれ, 0.05, 0.32, 0.02 mM であり, これらはそれぞれヒトの血清サンプル中における標準的な濃度である [138]。ドーパミンおよび尿酸は, Fig. 6.8 に示すようにチオニン修飾電極では応答が観察されず, 尿酸およびドーパミンの酸化に対しては, 電極触媒活性は観察されなかった。すなわちこれらの妨害物質が使用条件下でセンサーの応答に影響を与えないことがわかった。一方アスコルビン酸に対しては大きな電流応答が観測された。この現象は, Fig. 6.10 に示すようにチオニン修飾電極によるアスコルビン酸の電極触媒酸化の結果であると考えられる。これらからわかるように, チオニン修飾電極を NADH の電気化学的検出器として用いる場合には, 少なくともアスコルビン酸と NADH を前もって分離する必要がある。

6.3.2 フェノサフラニン修飾電極による NADH 触媒酸化

6.3.2.1 安定性

Fig. 6.11 は, 1mM NADH をおよそ 5 時間にわたって 100 回連続インジェクションした場合に得られた電流時間曲線である。フローインジェクション分析の NADH 検出電位は, -0.2 V とした。フェノサフラニンは, 式量レドックス電位 (-0.46 V) がチオニンのそれよりも負にあるので, -0.2 V という低い電位でも触媒酸化能を示した。得られたピーク電流は, NADH 非存在下, 存在下で得られた電流の差電流である。ピーク電流値は数十回のインジェクションの間に次第に減少した。しかしながらおよそ 80 回の後, 最初のインジェクションの電流値のおよそ 30% にはなるがほとんど一定の電流値が得られるようになった。結果としてこのような連続インジェクションはチオニン修飾電極の場合と同様, 一定の電流応答を得るためのフェノサフラニン修飾電極の“前処理”と見なすことができる。フェノサフラニン修飾電極もチオニン修飾電極の場合と同様に, このような“前処理”に比べてさらにより遅いタイムスケールの電流応答の時間変化が生じることを観測した。前処理をした電極を 0.2 M リン酸緩衝溶液 (pH7.0) 中室温で一昼夜保持した後のフェノサフラニンの表面被覆量はほとんど変化しなかったが, 電流応答は前処理直後に得られた電流応答の約 2 分の 1 に減少した。しかしながらこの電流応答は, さらに 1~2 時間のフローインジェクション分析を行なう間ほとんど変化しなかった。これらの事

実は、フェノサフラニン修飾電極が化学的に安定であり、フェノサフラニンが電極表面に強固に付着していることを示唆する。また、フェノサフラニン修飾電極は電流応答に対する遅い時間変化を示すことがわかったが、これは膜のゆっくりとしたモホロジー変化が原因と思われる

6.3.2.2 検量線

Fig. 6.12に $\Gamma=1.3 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ のフェノサフラニン修飾GC電極で得られたNADH検出の典型的な検量線を示す。このセンサーは、0.1mM~10mMのダイナミックレンジを持つこと、およびNADH濃度に対する電流値の初期勾配で示される感度が13nA/mMであることがわかった。

6.4 結論

チオニン修飾電極、フェノサフラニン修飾電極は共に化学的に安定であり、また電極表面に強固に付着していることがわかった。チオニン修飾電極を用いたNADHセンサーは、5 μ M~1mMのダイナミックレンジを有することがわかった。これは、生体試料のNADH濃度の検出ができることを示している。フェノサフラニン修飾電極を用いたNADHセンサーでは、-0.4 V vs. Ag/AgClという低い電位で、NADHを酸化できることがわかり、これまでに知られていないどの修飾電極よりも低い電位でNADHを酸化できることがわかった。これは、生体内でNADHが酸化される電位に匹敵する。これらの電極は、前処理を行なうことにより触媒電流値に再現性のあるフローインジェクション分析の電気化学的検出器として有用であることがわかった。

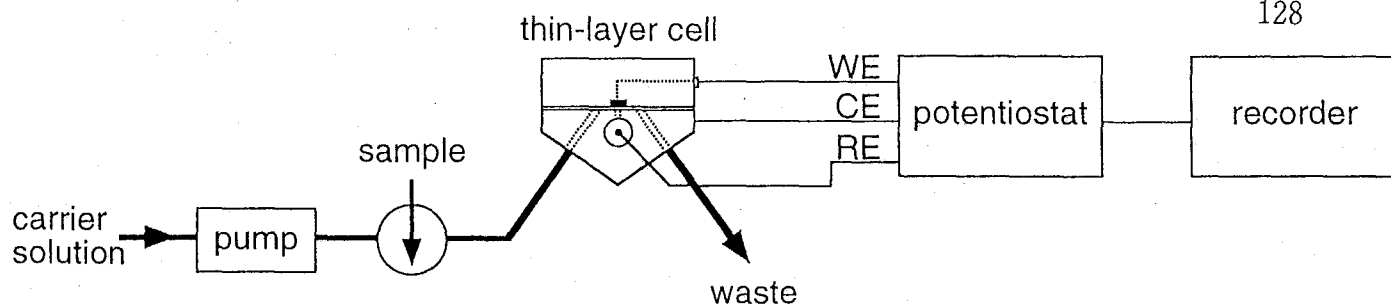


Fig. 6.1. Schematic representation of the flow - injection system and the measuring cell for the amperometric assay of NADH.

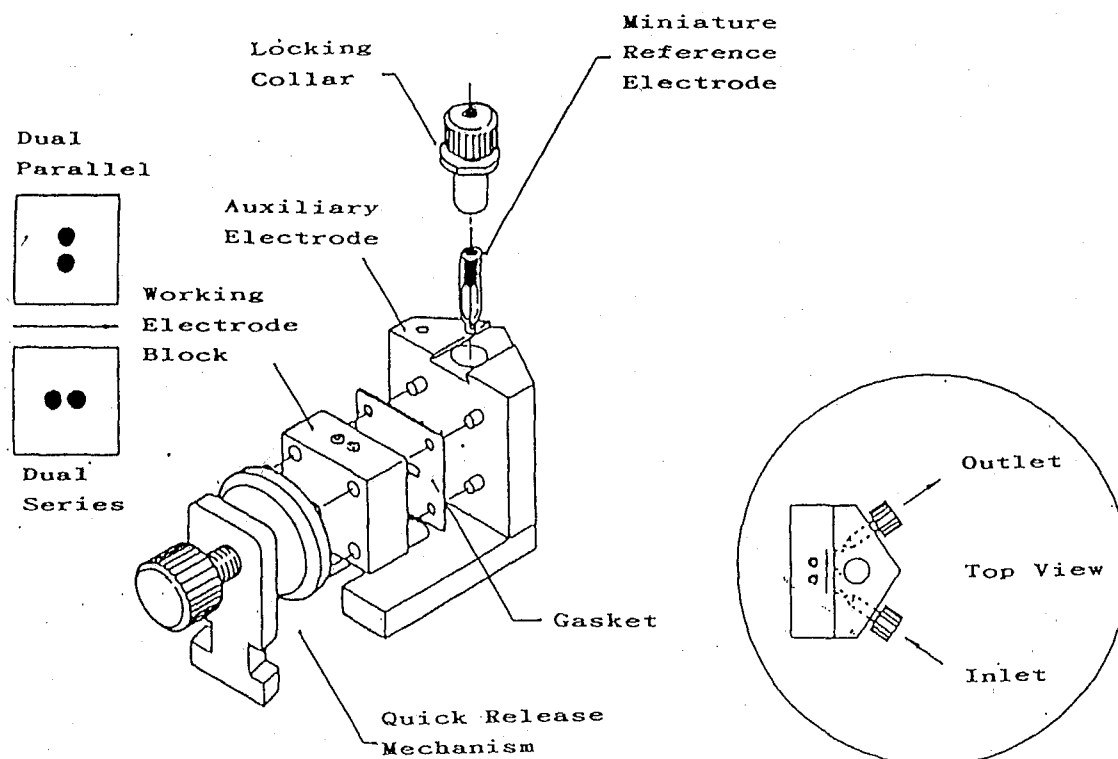


Fig. 6.2. Schematic representation of the thin - layer cell design for LC - 17A and BAS 200 systems.

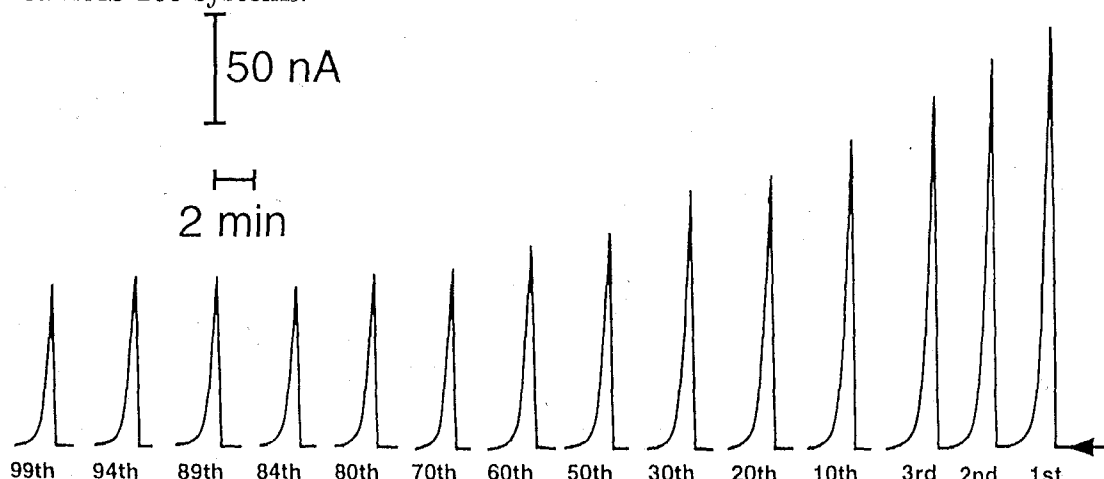


Fig. 6.3. Flow - injection responses obtained at the thionine-modified GC electrode detector. ($\Gamma = 1.3 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$) for successive injections of 1 mM NADH over a period of *ca.* 5h. Flow rate : 1.0 ml min^{-1} . Injected volume of NADH solution : $20 \mu\text{l}$. Applied potential : 0.1 V *vs.* Ag/AgCl. Electrolyte and carrier : 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). Surface coverage of the thionine - modified GC detector : $1.3 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$.

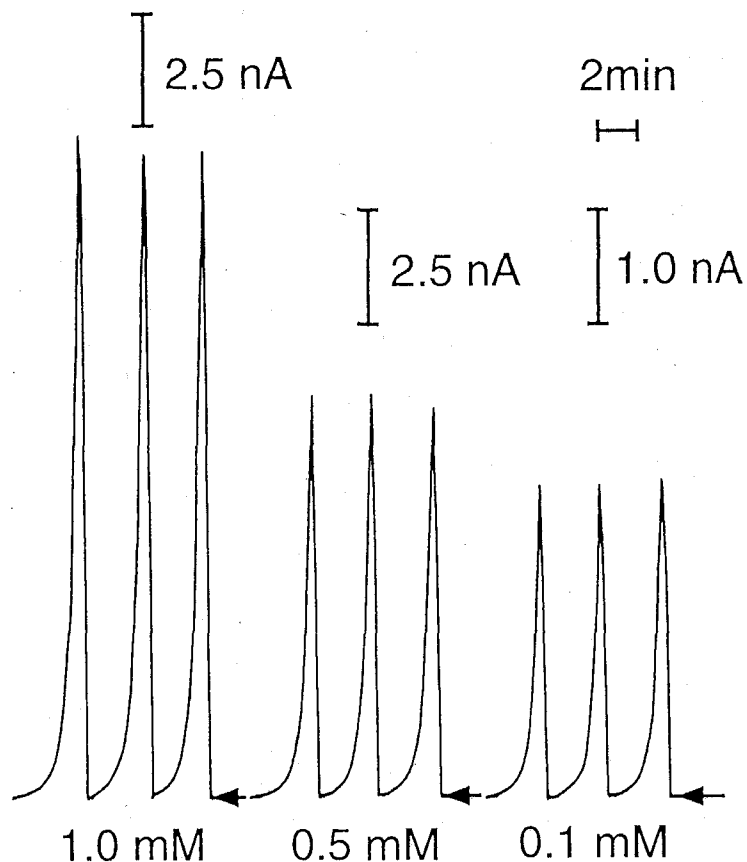


Fig. 6.4. Typical flow - injection current - time profiles for 0.1, 0.5, and 1.0 mM NADH at thionine - modified GC detector. Flow rate : 1.0 ml min^{-1} . Injected volume of NADH solution : $20 \mu\text{l}$. Applied potential : $0.1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Electrolyte and carrier : 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). The thionine-modified GC electrode was the same as that used in Fig.6.3.

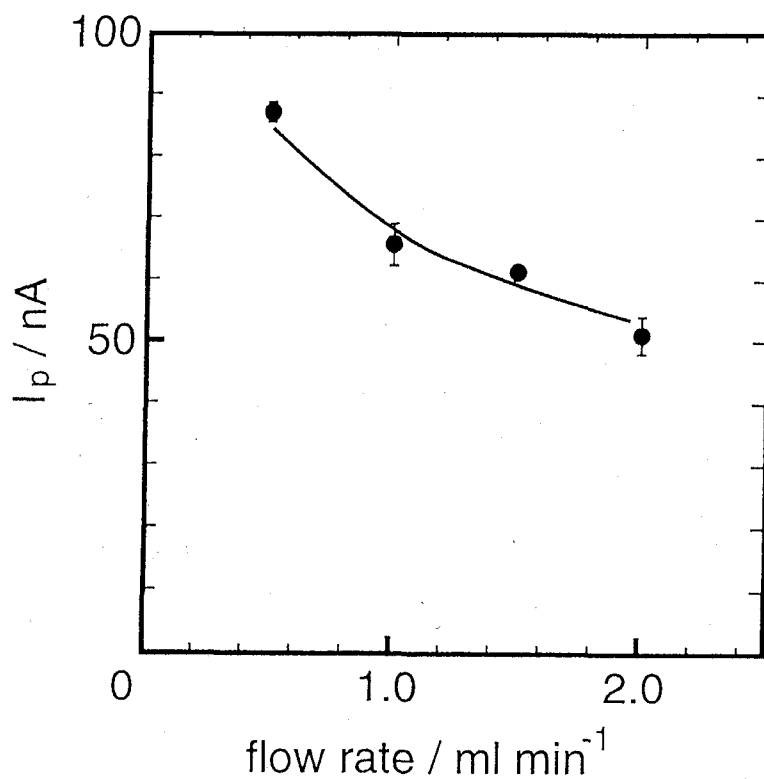


Fig. 6.5. Flow rate dependence of peak current (i_p) for 1 mM NADH. Injected volume of NADH solution : $20 \mu\text{l}$. Applied potential : $0.1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, $\text{KCl}(\text{sat'd})$. Electrolyte and carrier : 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

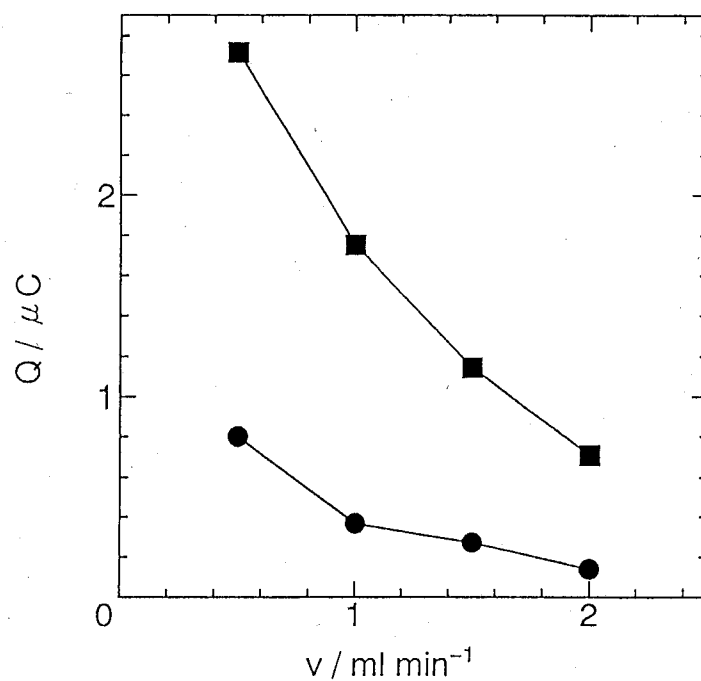


Fig. 6.6. Flow rate dependence of detected charge(Q) for 0.4 and 1.0 mM NADH at thionine - modified GC detector. Surface coverage of thionine was (■) 4.6×10^{-9} , and (●) 5.3×10^{-10} mol cm^{-2} , respectively.

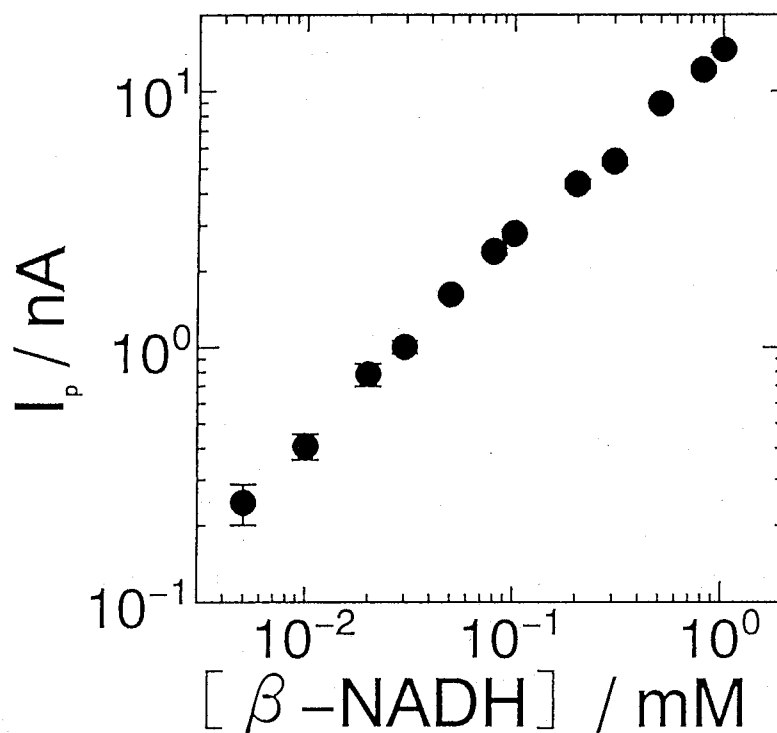


Fig. 6.7. A typical calibration curve of thionine-modified GC detector for NADH. Injected volume of NADH solution : 20 μl . Applied potential : 0.1 V vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd). Electrolyte and carrier : 0.2 M phosphate buffer solution(pH 7.0).

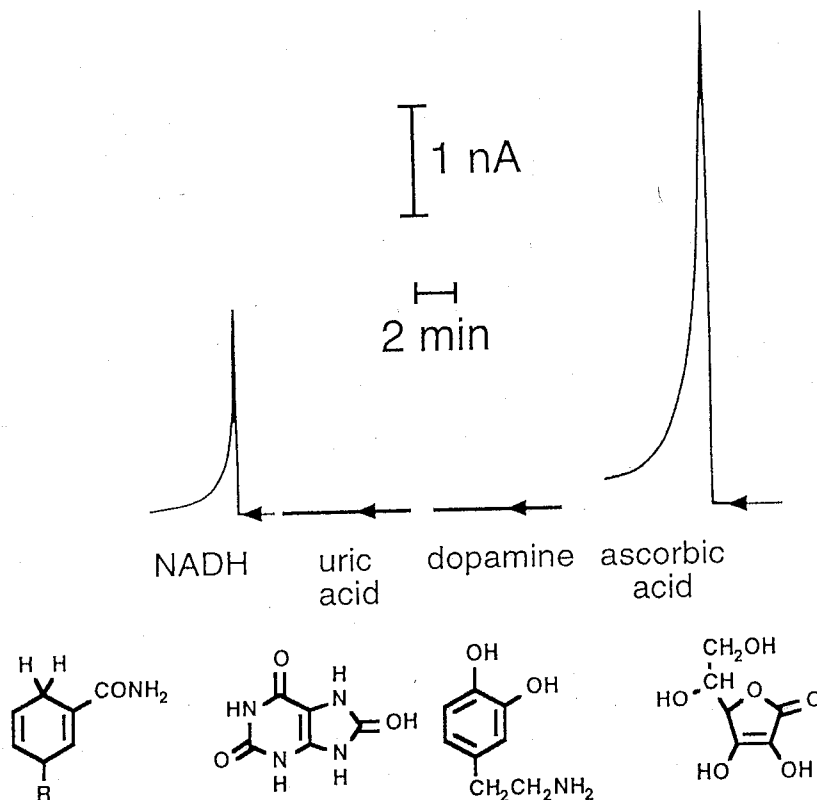


Fig. 6.8. Typical flow - injection response obtained at thionine - modified GC detector ($\Gamma = 8.1 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$) for ascorbic acid (0.05 mM), dopamine (0.02 mM), uric acid (0.32 mM) and NADH (1 mM). Injected volume of samples : 20 μl . Applied potential : 0.1 V vs. Ag/AgCl, KCl(sat'd). Electrolyte and carrier : 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

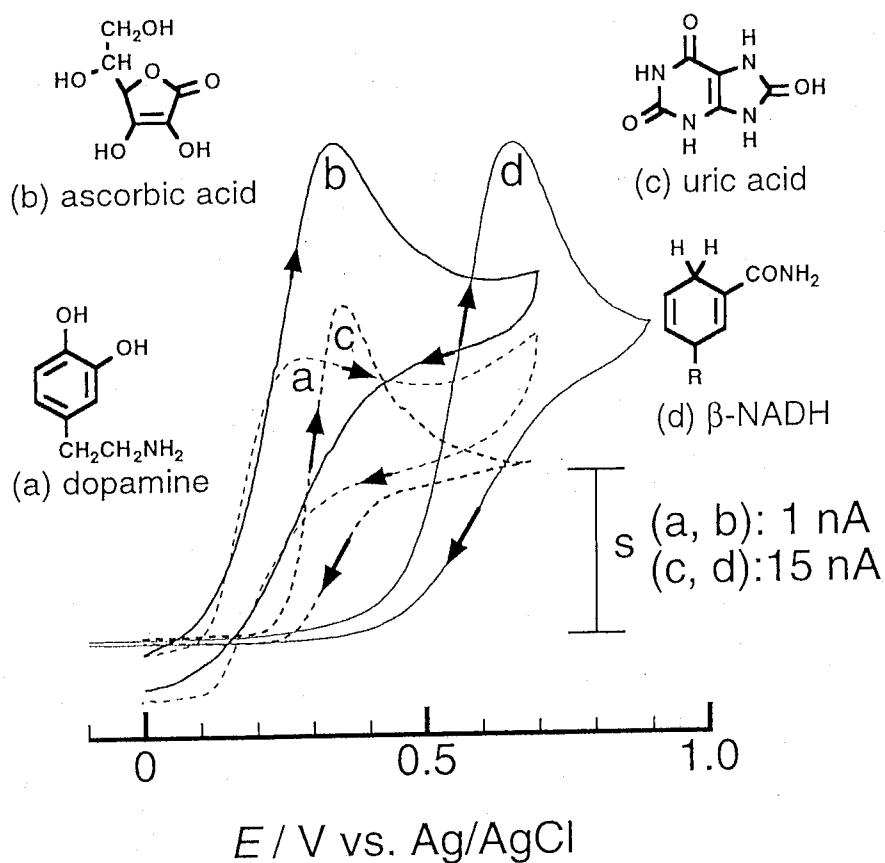


Fig. 6.9. Cyclic voltammograms of various substrates at a bare BPG electrode (0.2 cm^2) in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0). Substrates : (a) 0.02 mM dopamine, (b) 0.05 mM ascorbic acid, (c) 0.32 mM uric acid, (d) 1.0 mM NADH. Potential scan rate : 5 mV s^{-1} . Sensitivity (s) : (a, b) 1 nA, (c, d) 15 nA.

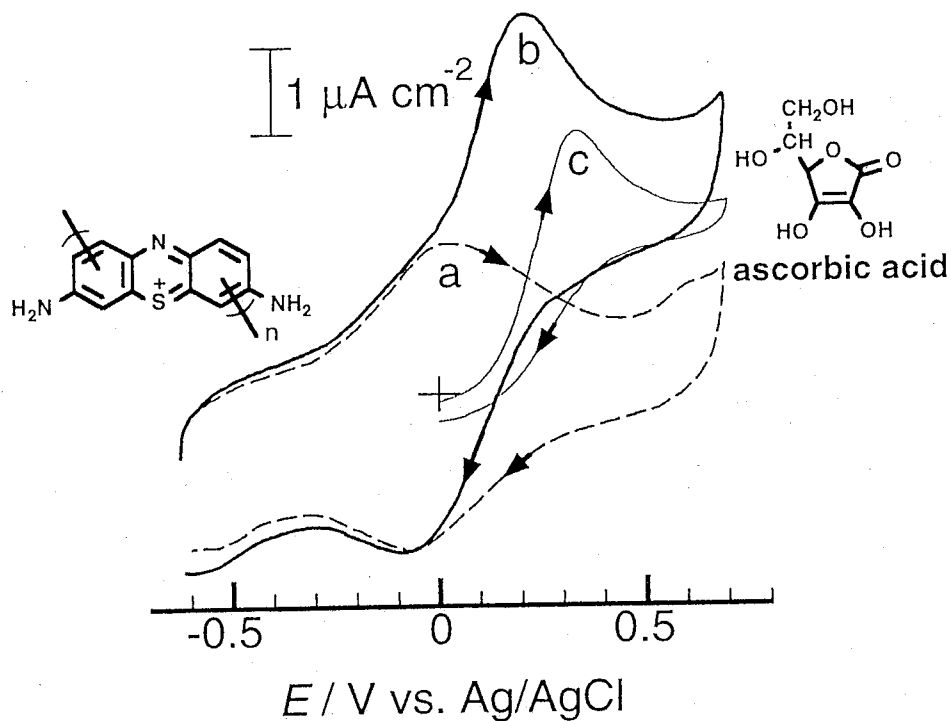


Fig. 6.10. Cyclic voltammograms of (a,b)thionine-modified BPG electrode in deaerated 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0) in the absence (a) and presence (b) of 0.05 mM ascorbic acid ($\Gamma = 3.3 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$). Voltammogram (c) was obtained at a bare BPG electrode in the presence of 0.05 mM ascorbic acid in the same buffer solution. Potential scan rate: 5 mV s^{-1} .

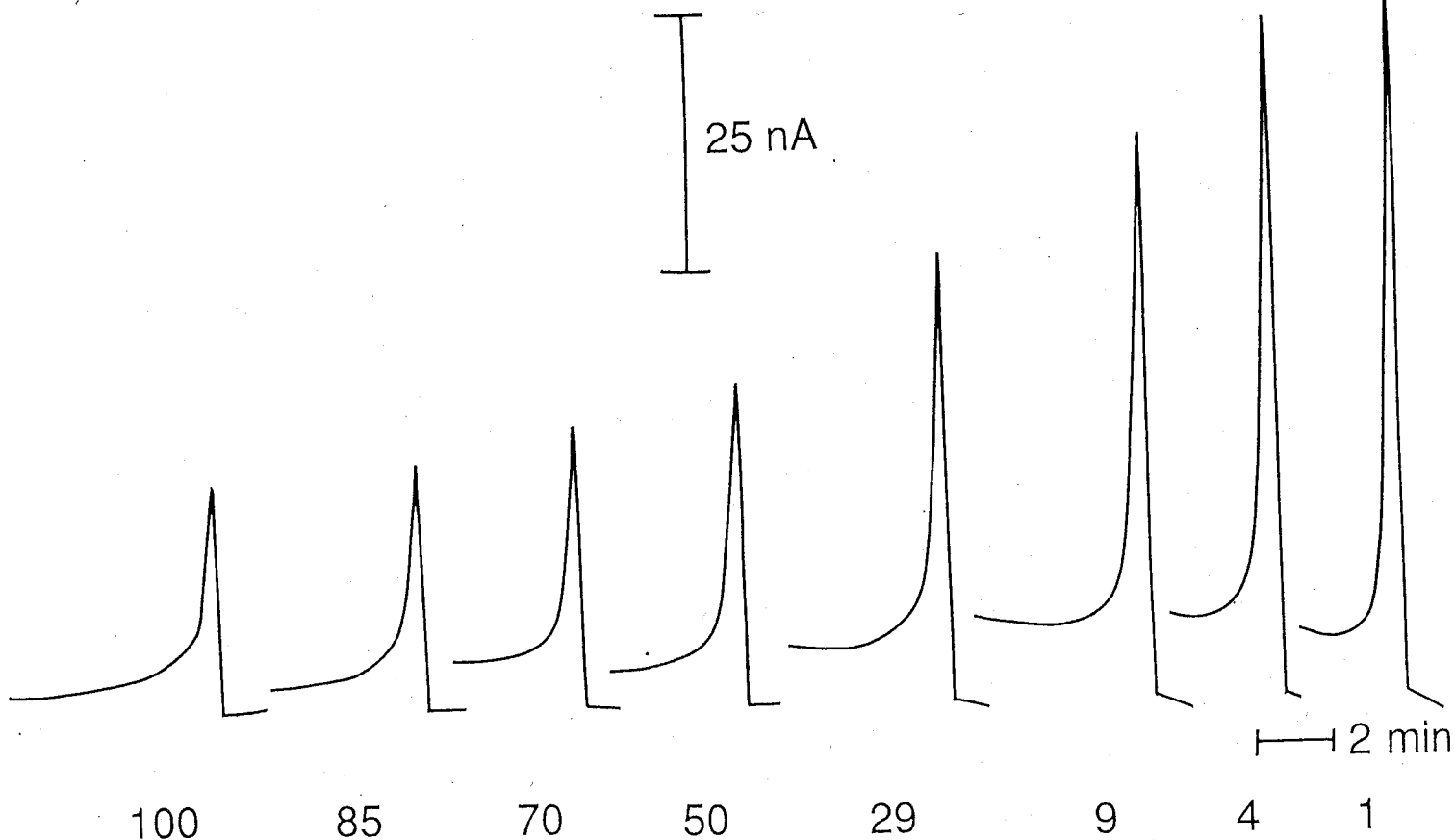


Fig. 6.11. Flow-injection responses obtained for successive injections of 1 mM NADH over a period of *ca.* 5h. at a phenosafranine-modified GC detector ($\Gamma = 1.6 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$). Flow rate: 1.0 ml min^{-1} . Injected volume of NADH solution: $20 \mu\text{l}$. Applied potential: $-0.2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Electrolyte and carrier: 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

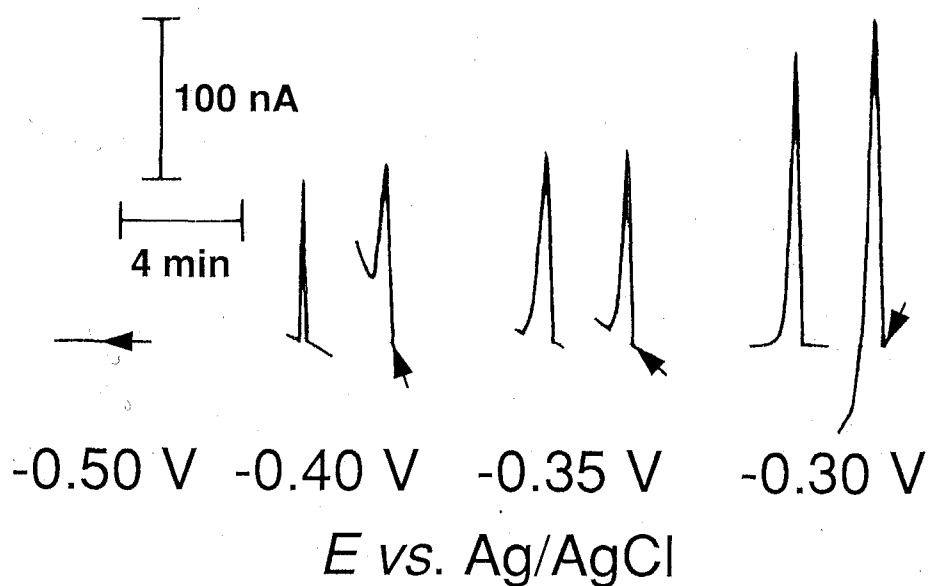


Fig. 6.12. Flow - injection responses obtained at a phenosafranine - modified GC detector. Injected volume of NADH solution : $20 \mu\text{l}$. Applied potential : $-0.50, -0.40, -0.35, -0.30 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Experimental conditions are the same as those in Fig.6.11.

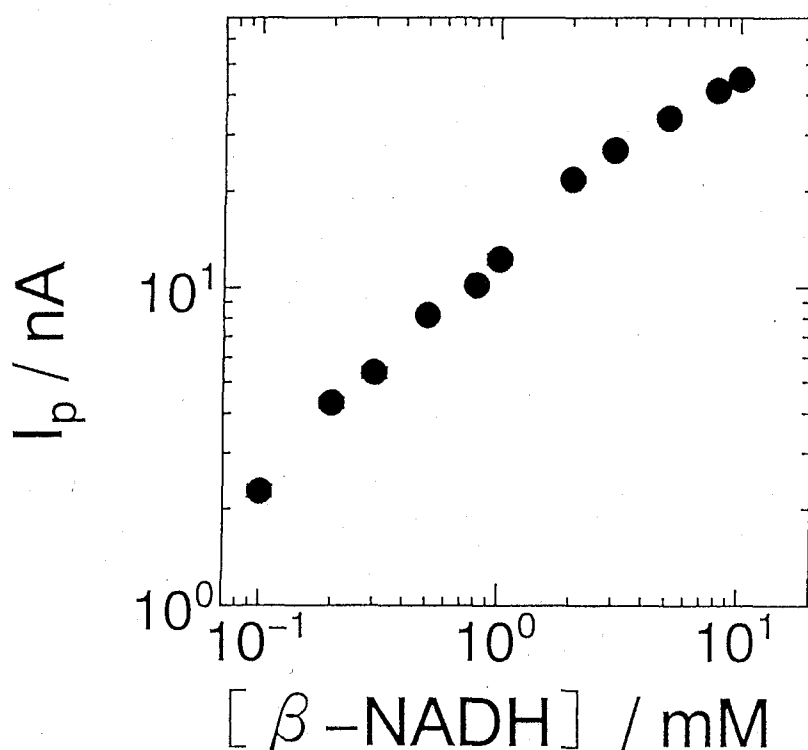


Fig. 6.13. A typical calibration curve of phenosafranine - modified GC detector for NADH ($\Gamma = 1.3 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$). Injected volume of NADH solution : $20 \mu\text{l}$. Applied potential : $-0.2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, KCl(sat'd). Electrolyte and carrier : 0.2 M phosphate buffer solution(pH 7.0).

第7章

総括

本研究の内容を総括すると以下のとおりである。

第1章「序論」では、レドックス機能性分子であるアジン色素(特にチオニン及びフェノサフラニン)及び生体内の250種類以上の脱水素酵素が必要としている補酵素 NAD^+ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)とその還元体 NADH の概説を行ない、さらにこれまでの研究の背景、及び本研究の意義と目的について述べた。

第2章「フェノサフラニン色素誘導体の合成およびキャラクタリゼーション」では、フェニル基に官能基を導入したフェノサフラニン誘導体のインダミンと4-アルキルアニリンからの合成、これらの誘導体及びアルキルフェナジニウム骨格に官能基を導入したフェノサフラニン誘導体の式量電位(E°)の測定、及び紫外可視吸収スペクトル測定による極大吸収波長(λ_{max})の評価について述べた。官能基をフェニル基に導入するよりもアルキルフェナジニウム骨格に導入する方が、 E° 値が大きく変化(フェノサフラニンの E° 値から百数十mV変化)することを見い出し、これは自由回転するフェニル基が色素のアルキルフェナジニウム平面に対して垂直に位置し、 π 電子共役系を広げることができないためであると結論した。

第3章「アジン色素薄膜修飾電極の電解作製およびそのキャラクタリゼーション」では、アミノ基を持つアジン色素の電解酸化による電極上へのレドックス活性薄膜の作製について述べた。サイクリックボルタンメトリーによる酸化還元応答の電気化学的解析から、中性のpH領域では溶存フェノサフラニンは1対の可逆なレドックス応答を示すのに対して、フェノサフラニン薄膜修飾電極は2対の可逆なレドックス応答を示すことを明らかにした。また、電解作製したフェノサフラニン薄膜色素の紫外可視吸収スペクトルは、溶存フェノサフラニンのそれと比べてブロードであり、かつ極大吸収波長(λ_{max})が長波長

側へシフトすることを明らかにし、これらの結果から、薄膜化したフェノサフラニンの電気化学的、分光学的性質は溶存状態のそれと異なり、レドックスサイト近傍のマイクロ環境が変化していることが明らかとなった。

第4章「アジン色素修飾電極によるNADHの触媒酸化」では、アジン色素修飾電極の著しいNADH酸化触媒能について述べた。色素を薄膜化して電極に修飾することによりNADH酸化の触媒電流密度が著しく増大することを見出し、触媒の薄膜化の利点を明らかにした。チオニン及びフェノサフラニン薄膜修飾電極では、未修飾電極に比べてNADHの酸化反応の過電圧がそれぞれ0.4 V及び1V以上低くなることを見出した。特にフェノサフラニン薄膜修飾電極は $-0.4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ でNADHを酸化することができ、生体系におけるフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)によるNADHの酸化に匹敵することを見出した。回転円盤電極を用いる対流ボルタンメトリーにより、NADHの電極触媒酸化の反応機構を解析し、関連する速度論的パラメータを評価し、触媒反応の速度定数と一連のアジン色素の E° 値との間には線形自由エネルギー関係が成り立つことを見出した。

第5章「半経験的分子軌道法による考察」では、一連のアジン色素及びキノン化合物のLUMO(最低空軌道)のエネルギー準位及びNADHモデル化合物のHOMO(最高被占軌道)のエネルギー準位の半経験的分子軌道計算(PM3法)の結果について述べた。NADHの酸化に対して高い触媒能を有することが知られている一連のキノン化合物のLUMOのエネルギー準位と比較して、一連のアジン色素のLUMOのエネルギー準位は低く、またNADHモデル化合物のHOMOのエネルギー準位との差は、アジン色素の方がより小さいことを見出し、軌道相互作用の原理からキノン化合物よりもアジン色素の方がNADHとより大きな相互作用を行ない、結果としてより高いNADH酸化触媒能を有することを明らかにした。また、分子軌道の位相の対称性の観点から、*o*-キノンと*p*-キノンによるNADH触媒酸化の反応速度定数の差異を説明することに成功し、電子移動触媒のLUMOのエネルギー準位だけでなく分子軌道の位相表示もまた電子移動触媒を選択する際の重要な指針となることを明らかにした。また、第4章で求めたNADH触媒酸化の反応速度定数とアジン色素のLUMOのエネルギー準位との間には線形自由エネルギー関係が成り立つことを初めて見出した。

第6章「アジン色素修飾電極のNADH電気化学検出器としての応用」では、アジン色素修飾電極は化学的に安定で、迅速なレドックス応答を示し、またNADHに対して広いダイナミックレンジを持つため、NADHのフローインジェクション分析における電気化学検出器として有用であることを見出した。

参考文献

- [1] 久保亮五, 長倉三郎, 井口洋夫, and 江沢洋, “岩波 理化学辞典 第4版,” 株式会社 岩波書店, (1987).
- [2] 大木道則, 大沢利昭, 田中元治, and 千原秀昭, “化学大辞典,” 株式会社 東京化学同人, (1989).
- [3] 西久夫, “色素の化学, インジゴからフタロシアニンまで,” 共立出版株式会社, 東京 (1985).
- [4] 西久夫 and 北原清志, “続色素の化学, 色素の機能性,” 共立出版株式会社, 東京 (1992).
- [5] 高松秀機, “研究開発物語, 創造は天才だけのものか, 模倣は創造への第一歩,” 株式会社化学同人, 京都 (1992).
- [6] Williams, *BP*, 1090 (1859).
- [7] T. S. of Dyers and Colourists, “COLOUR INDEX Third Ed.,” The Society of Dyers and Colourists, (1971).
- [8] Witt, *J. Soc. Chem. Ind. (London)*, 1, 255 (1882).
- [9] J. F. Corbett, *J. Soc. Dyers and Colourists*, 88, 438–443 (1972).
- [10] K. R. Gopidas and P. V. Kamat, *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 48, 291–301 (1989).
- [11] 谷忠昭, 菊池真一, and 細谷一雄, *工業化学雑誌*, 71, 322–326 (1968).
- [12] T. Tani, K. Honda, and S. Kikuchi, *J. Electrochem. Soc. Japan*, 37, 17–23 (1969).
- [13] Z. Balcarová, V. Kleinwächter, J. Koudelka, R. Klarner, and G. Löber, *Biophysical Chemistry*, 8, 17–25 (1978).

- [14] H. Bünemann, N. Dattagupta, H. J. Schuetz, and W. Müller, *Biochemistry*, **20**, 2864–2874 (1981).
- [15] W. Müller, H. Bünemann, H. Schuetz, and A. Eigel, Nucleic acid interacting dyes suitable for affinity chromatography, partitioning and affinity electrophoresis, in “*Affinity Chromatography and Related Techniques*,” ed. by T. C. F. Gribnau and R. L. F. Nivard, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, (1982), .
- [16] M. Maeda, A. Hirai, and M. Takagi, *Chemistry Letters*, 1831–1834 (1989).
- [17] K. Yamaoka, in “高分子学会予稿集,” 高分子学会, 名古屋 (1994), pp II-2-IL-02.
- [18] A. Sharma and M. A. Arnold, *Spectrochimica Acta*, **48A**, 647–651 (1992).
- [19] 徳丸克己 and 大河原信, “増感剤,” 株式会社 講談社サイエンティフィック, (1987).
- [20] T. L. Osif, N. N. Lichtin, and M. Z. Hoffman, *Phys. Chem.*, **82**, 1778–1784 (1978).
- [21] 徳田耕一, 池上伸, 本多健一, and 菊池真一, *工業化学雑誌*, **72**, 105–108 (1969).
- [22] A. R. Hillman, D. C. Loveday, S. Bruckenstein, and C. P. Wilde, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **86**, 437–438 (1990).
- [23] A. R. Hillman, D. C. Loveday, M. J. Swann, S. Bruckenstein, and C. P. Wilde, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **87**, 2047–2053 (1991).
- [24] J. Ye and R. P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **60**, 2263–2268 (1988).
- [25] E. Zeffren and P. L. Hall, “酵素反応機構,” 学会出版センター, 東京 (1977).
- [26] P. F. Leadlay, “酵素化学入門,” 丸善株式会社, 東京 (1981).
- [27] B. W. Carlson and L. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 479–485 (1985).

- [28] S. Fukuzumi, N. Nishizawa, and T. Tanaka, *Chemistry Letters*, 1755–1758 (1983).
- [29] S. Fukuzumi, S. Koumitsu, K. Hironaka, and T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 305–316 (1987).
- [30] L. L. Miller and J. R. Valentine, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3982–3989 (1988).
- [31] 藤本博, 山辺信一, and 稲垣都士, “有機反応と軌道概念,” 株式会社 化学同人, (1986).
- [32] S. Inagaki and Y. Hirabayashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 50 (1977).
- [33] S. Fukuzumi, N. Nishizawa, and T. Tanaka, *J. Org. Chem.*, **49**, 3571–3578 (1984).
- [34] 日本化学会, “季刊化学総説1, バイオセンシングとそのシステム,” 学会出版センター, (1988).
- [35] J. Bonnefoy, J. Moiroux, J.-M. Laval, and C. Bourdillon, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **84**, 941–950 (1988).
- [36] A.-E. Biade, C. Bourdillon, J.-M. Laval, G. Mairesse, and J. Moiroux, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 893–897 (1992).
- [37] H. K. Chenault and G. M. Whitesides, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **14**, 147–197 (1987).
- [38] P. N. Bartlett, A. P. F. Turner, I. Karube, and G. S. Willson, ed., “Biosensors, principle and applications,” Oxford University Press, (1987).
- [39] J. Moiroux and P. J. Elving, *Anal. Chem.*, **50**, 1056–1062 (1978).
- [40] J. Moiroux and P. J. Elving, *Anal. Chem.*, **51**, 346–350 (1979).
- [41] Z. Samec and P. J. Elving, *J. Electroanal. Chem.*, **144**, 217–234 (1983).
- [42] K. Tanaka, S. Ikeda, N. Oyama, K. Tokuda, and T. Ohsaka, *Anal. Sci.*, **9**, 783–789 (1993).
- [43] M. L. Fultz and R. A. Durst, *Anal. Chim. Acta*, **5**, 85–91 (1987).

- [44] B. Persson, *J. Electroanal. Chem.*, **287**, 61–80 (1990).
- [45] L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, and G. Johansson, *J. Electroanal. Chem.*, **161**, 103–120 (1984).
- [46] G. Bremle, B. Persson, and L. Gorton, *Electroanalysis*, **3**, 77–86 (1991).
- [47] B. Persson, L. Gorton, and G. Johansson, ed., “In Proceeding of the 2nd International Meeting on Chemical sensors,” Bordeaux(1986)Imprimerie Biscaye.
- [48] H. F. Huck, *Anal. Chem.*, **313**, 548–552 (1982).
- [49] Y. Kashiwagi and T. Osa, *Chem. Lett.*, 677–680 (1993).
- [50] T. Fuchigami, T. Shintani, A. Konno, and T. Nonaka, *DENKI KAGAKU*, **62**, 1251–1253 (1994).
- [51] D. C.-S. Tse and T. Kuwana, *Anal. Chem.*, **50**, 1315–1318 (1978).
- [52] C. Ueda, D.-S. Tse, and T. Kuwata, *Anal. Chem.*, **54**, 850–856 (1982).
- [53] C. Degrand and L. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5728–5732 (1980).
- [54] M. Fukui, A. Kitani, C. Degrand, and L. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 28–33 (1982).
- [55] A. N. K. Lau and M. L. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5271–5277 (1983).
- [56] H. Jaegfeldt, A. B. C. Torstensson, L. G. O. Gorton, and G. Johansson, *Anal. Chem.*, **53**, 1979–1982 (1981).
- [57] H. Jaegfeldt, T. Kuwata, and G. Johansson, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 1805–1814 (1983).
- [58] K. Ravichandran and R. P. Baldwin, *J. Electroanal. Chem.*, **126**, 293–300 (1981).
- [59] M. Kunitake, K. Akiyoshi, K. Kawatana, N. Nakashima, and O. Manabe, *J. Electroanal. Chem.*, **292**, 277–280 (1990).
- [60] E. Katz, T. Lötzbeyer, D. D. Schlereth, and W. Schuhmann, *J. Electroanal. Chem.*, **373**, 189–200 (1994).

- [61] T. Ikeda, T. Shibata, and M. Senda, *J. Electroanal. Chem.*, **261**, 351–362 (1989).
- [62] H. Huck and H.-L. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 402–403 (1981).
- [63] G. Arai, M. Matsushita, and I. Yasumori, *Nippon Kagaku Kaishi*, **5**, 894–897 (1985).
- [64] K. Miki, T. Ikeda, S. Todoroki, and M. Senda, *Anal. Sci.*, **5**, 269–274 (1989).
- [65] T. Matsue, N. Kasai, M. Narumi, M. Nishizawa, H. Yamada, and I. Uchida, *J. Electroanal. Chem.*, **300**, 111–118 (1991).
- [66] M. Ohtani, S. Kuwabata, and H. Yoneyama, in “Abstracts of '95 Asian conference on electrochemistry,” Suita, Osaka, Japan May (1995), pp 1P–121.
- [67] K. Hajizadeh, H. T. Tang, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, *Anal. Lett.*, **24**, 1453 (1991).
- [68] H. P. Bennetto, J. L. Stirling, and K. Tanaka, *Chemistry and Industry (London)*, 695 (1985).
- [69] B. Yon Hin and C. R. Lowe, *Anal. Chem.*, **59**, 2111–2115 (1987).
- [70] J. Wang and T. Golden, *Anal. Chim. Acta.*, **217**, 343–351 (1989).
- [71] L. Gorton, G. Johansson, and A. Torstensson, *J. Electroanal. Chem.*, **196**, 81–92 (1985).
- [72] M. Polasek, L. Gorton, R. Appelqvist, G. Marko-varga, and G. Johansson, *Anal. Chim. Acta.*, **246**, 283–292 (1991).
- [73] O. Miyawaki and L. B. Wingard, Jr., *Biochim. Biophys. Acta*, **838**, 60–68 (1985).
- [74] L. Gorton, G. Bremle, E. Csoeregi, G. Joesson-Pettersson, and B. Persson, *Anal. Chim. Acta*, **249**, 43–54 (1991).

- [75] A. Torstensson and L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.*, **130**, 199–207 (1981).
- [76] Y. Kimura and K. Niki, *Anal. Sci.*, **1**, 271–274 (1985).
- [77] J. Kulys, *J. Biosensors*, **2**, 3–13 (1986).
- [78] K. McKenna, S. E. Boyette, and A. Brajter-Toth, *Anal. Chim. Acta*, **206**, 75–84 (1988).
- [79] L. Gorton, B. Persson, P. D. Hale, L. I. Boguslavsky, H. I. Karan, H. S. Lee, T. A. Skotheim, H. L. Lan, and Y. Okamoto, *ACS symposium series*, **487**, 56–83 (1992).
- [80] R. J. Waltman and J. Bargon, *Can. J. Chem.*, **64**, 76–95 (1986).
- [81] J. H. Ottaway, *Biochem. J.*, **99**, 253–256 (1966).
- [82] S. A. Ahmed and A. Claiborne, *J. Biol. Chem.*, **267**, 3832–3840 (1992).
- [83] N. O. Kaplan and R. H. Sarma, “Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases,” Springer Verlag, Berlin, Proc. Adv. Study Inst. (1970).
- [84] C.-J. Yoon, H. Ikeda, R. Kojin, T. Ikeda, and F. Toda, *Journal of Inclusion Phenomena*, **5**, 85–91 (1987).
- [85] ACS, “Chemical Abstracts Vol.1,” The American Chemical Society, (1907).
- [86] C. J. Pouchert, “The Aldrich Library of Infrared Spectra, 3rd ed.,” Aldrich Chemical Company, Inc., (1981).
- [87] C. J. Pouchert, “The Aldrich Library of NMR Spectra, 2nd ed.,” Aldrich Chemical Company, Inc., (1983).
- [88] 日本免疫学会, “免疫実験法 A, I,II,III, 合本,” 日本免疫学会, (1975).
- [89] W. Müller, I. Hattesoehl, H. Schuetz, and G. Meyer, *Nucleic Acids Research*, **9**, 95–119 (1981).
- [90] W. J. Albery, A. W. Foulds, K. J. Hall, A. R. Hillman, R. G. Egdell, and A. F. Orchard, *Nature*, **282**, 793–797 (1979).

- [91] K. Hutchinson and R. E. Hester, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **80**, 2053–2071 (1984).
- [92] A. J. Mcquillan and M. R. Reid, *J. Electroanal. Chem.*, **194**, 237–245 (1985).
- [93] W. J. Albery, M. G. Boutelle, P. J. Colby, and A. R. Hillman, *J. Electroanal. Chem.*, **133**, 135–145 (1982).
- [94] J. M. Bauldrey and M. D. Archer, *Electrochimica Acta*, **28**, 1515 (1983).
- [95] 小山昇, 千葉和幸, 大貫由紀夫, and 大坂武男, 日本化学会誌, 1172–1177 (1985).
- [96] A. J. Bard and L. R. Faulkner, “Electrochemical methods — Fundamentals and Applications—,” John Wiley & Sons, Inc., New York, (1980).
- [97] T. Ohsaka, M. Ohba, M. Saito, N. Oyama, S. Tanaka, and S. Nakamura, *J. Electroanal. Chem.*, **194**, 237 (1985).
- [98] J. Kulys and A. Malinauskas, *Liet. TSR Mokslu Akad., Darb., Ser.*, **B4**, 41 (1979).
- [99] 玉虫伶太, “電気化学(第2版),” 株式会社 東京化学同人, (1991).
- [100] J. Ziegenhorn, M. Senn, and T. Bücher, *Clin. Chem.*, **22/2**, 151–160 (1976).
- [101] E. E. Conn, P. K. Stumpf, G. Bruening, and R. H. Doi, “コーン・スタンブ 生化学 第5版,” 株式会社 東京化学同人, 東京 (1988).
- [102] C. C. Johnston, J. L. Gardner, C. H. Suelter, and D. E. Metzler, *Biochemistry*, **2**, 689–696 (1963).
- [103] F. Ni, H. Feng, L. Gorton, and T. M. Cotton, *Langmuir*, **6**, 66–73 (1990).
- [104] R. W. Murray, ed., “Molecular Design of Electrode Surfaces,” John Wiley & Sons, Inc., New York (1992).

- [105] C. P. Andrieux and J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.*, **134**, 163–166 (1982).
- [106] 大坂武男 and 小山昇, 表面, 549–567 (1984).
- [107] C. P. Andrieux, J. M. Dumas-Boushiat, and J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.*, **131**, 1–35 (1982).
- [108] J. Leddy, A. J. Bard, J. T. Maloy, and J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.*, **187**, 205 (1985).
- [109] P. Daum and R. W. Murray, *J. Phys. Chem.*, **85**, 389 (1981).
- [110] R. D. Rocklin and R. W. Murray, *J. Phys. Chem.*, **85**, 2104 (1981).
- [111] N. Oyama and F. C. Anson, *Anal. Chem.*, **52**, 1192 (1980).
- [112] 小山昇, 大貫由紀夫, 大坂武男, and 松田博明, 日本化学会誌, 949 (1983).
- [113] 佐藤馨一, 「高分子薄膜被覆電極における電子移動に関する研究」東京工業大学博士論文(1985).
- [114] P. W. Atkins, “アトキンス 物理化学(第2版),” 株式会社 東京化学同人, (1982).
- [115] 井本稔 and 仲矢, “有機反応論(上),” 株式会社 東京化学同人, (1982).
- [116] B. Persson and L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.*, **292**, 115–138 (1990).
- [117] J. J. P. Stewart and 内田希, “MOPAC マニュアル Version 6,” 日本化学プログラム交換機構, (1991).
- [118] 大澤映二, 田辺和俊, 水野正城, and 杉江正昭, “計算化学ガイドブック — 3 大分子計算プログラムの解説—,” 丸善株式会社, (1988).
- [119] 平野恒夫 and 田辺和俊, “分子軌道法 MOPAC ガイドブック,” 海文堂出版株式会社, (1991).
- [120] 大澤映二, 木原寛, 内田希, and 生田茂, “計算化学シリーズ, 分子軌道法,” 丸善株式会社, (1988).
- [121] C. H. Suelter and D. E. Metzler, *Biochimica et Biophysica Acta*, **44**, 23–33 (1960).

- [122] R. E. Vasquez, A. Kitani, K. Sasaki, and Y. Yano, *Rev. Polarography*, **30**, 51 (1984).
- [123] R. E. Vasquez, A. Kitani, K. Sasaki, and Y. Yano, *Rev. Polarography*, **31**, 50 (1985).
- [124] N. K. Cenas, J. J. Kanapieniene, and J. J. Kulys, *Biochimica et Biophysica Acta*, **767**, 108–112 (1984).
- [125] 福井謙一, “化学反応と電子の軌道,” 丸善株式会社, (1976).
- [126] 日本化学会, “化学総説38, 福井謙一とフロンティア軌道理論,” 学会出版センター, (1983).
- [127] 日本化学会, “化学総説1, 分子軌道理論からみた有機化学反応,” 東京大学出版会, (1973).
- [128] L. L. Miller and J. R. Valentine, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3982–3989 (1988).
- [129] H. Umeyama, A. Imamura, and C. Nagata, *Journal of Theoretical Biology*, **46**, 1–19 (1974).
- [130] S. Shifrin, *Biochimica et Biophysica Acta*, **81**, 205–213 (1964).
- [131] 中平隆幸, 後藤貴祥, 出口和宏, 善国麻佐子, and 岩淵晋, in “高分子学会予稿集,” 高分子学会, 名古屋 (1994), pp II-P3a017.
- [132] 戸倉仁一郎, “化学増刊48, 電荷移動錯体(上),” 株式会社 化学同人, (1971).
- [133] T. Sakurai, *Acta Cryst.*, **B24**, 403 (1968).
- [134] T. Sakurai, *Acta Cryst.*, **19**, 320 (1965).
- [135] M. E. Brewster, E. Pop, M.-J. Huang, and N. Bodor, *Heterocycles*, **37**, 1373 – 1415 (1994).
- [136] H. U. Bergmeyer, ed., “Methods of Enzymatic Analysis,” 3rd ed., Vol. 1 Verlag Chemie, Florida (1983).

- [137] N. F. Atta, A. Galal, A. E. Karagoezler, H. Zimmer, J. F. Rubinson, and H. B. Mark, Jr., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **19**, 1347–1349 (1990).
- [138] N. Oyama, T. Ohsaka, and S. Ikeda, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A27**, 1203 (1990).
- [139] T. Ohsaka, K. Taguchi, S. Ikeda, and N. Oyama, *DENKI KAGAKU*, **58**, 1136 (1990).

発表論文リスト

- (1) Electrocatalysis of Poly(thionine) - modified Electrodes for Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide; T. Ohsaka, K. Tanaka and K. Tokuda, *J.Chem.Soc.Chem.Commun.*, No. 3, 222-224 (1993).
- (2) An Excellent Electrocatalysis of Poly(Phenosafranine) - modified Electrode for Oxidation of Reduced β - Nicotinamide Adenine Dinucleotide; K. Tanaka, K. Tokuda and T. Ohsaka, *J.Chem.Soc.Chem.Commun.*, No. 23, 1770-1772 (1993).
- (3) Preparation of Poly(thionine) - modified Electrode and Its Application to an Electrochemical Detector for the Flow - Injection Analysis of NADH; K. Tanaka, S. Ikeda, N. Oyama, K. Tokuda and T. Ohsaka, *Anal.Sci.*, **9**, 783-789 (1993).
- (4) Electrochemical Properties of Phenosafranine Film Adsorbed on Electrodes in Aqueous Solutions; K. Tanaka, K. Tokuda and T. Ohsaka, in preparation.
- (5) Electrocatalytic Oxidation of NADH by Azine Dye - modified Electrodes; K. Tanaka, K. Tokuda and T. Ohsaka, in preparation.
- (6) Electrode Reaction of Phenosafranine at Basal - plane Pyrolytic Graphite Electrode; K. Tanaka, K. Tokuda and T. Ohsaka, in preparation.
- (7) Correlation between Electrocatalysis of Redox Mediators for Oxidation of NADH and Their Molecular Structures; K. Tanaka, S. Kawauchi, K. Tokuda and T. Ohsaka, in preparation.

謝辞

本研究を行なうにあたり、終始変わらぬ暖かい御指導と多大なるご配慮を賜りました本学 電子化学専攻助教授 大坂武男先生に心から感謝いたします。適切な御指導と討論を賜りました本学 電子化学専攻 教授 徳田耕一 先生に心から感謝いたします。また、本研究を行なうにあたり、多くの有益な討論と助言を賜りました本学 電子化学専攻 岡島武義博士、北村房男博士に深く感謝致します。

フローインジェクション分析機器を快く使用させていただきました東京農工大学 工学部 物質生物工学科 教授 小山昇先生に深く感謝致します。フローインジェクション分析の実験にあたり、御指導いただきました東京農工大学 工学部 物質生物工学科 小山研究室 池田信 博士に深く感謝致します。色素の合成方法に関して、本学 電子化学専攻鈴木将人助教授、富田育義博士に御助言をいただきました。ここに感謝いたします。NMR測定に関して本学 資源化学研究所 中村義之 博士および本学 電子化学専攻 淵上研究室 昆野 昭則 博士にお世話になりました。ここに感謝いたします。

本学 電子化学専攻 岡崎進 助教授には、計算化学の質問に快く答えていただきました。ここに感謝致します。本学 工学部高分子工学科 川内進 博士には、分子軌道計算プログラムパッケージ mopac ver 6.0 計算用の C-shell (バッチプログラム) を作製していただき、また、幾度にもわたる御指導と討論を賜りました。ここに感謝いたします。分子軌道計算の計算結果の図示には、Fairy Rings for Windows というソフトウェアを用いました。このプログラムは、淵上高正氏開発のプログラムであり、パソコン通信ネットワーク Nifty Serve 上で入手したものを、正規ユーザー登録をして用いました。このソフトのおかげで、考察を深める事ができました。ここに感謝いたします。京都大学化学研究所 山崎教正 技官には、NADH の計算化学の文献を紹介していただきました。感謝いたします。千葉大学工学部 中平研究室 出口和弘さんには、分子軌道計算の内部座標の設定について御教示いただきました。ここに感謝いたします。東京理科大学 理工学部 小林研究室 唐沢真実さん、東京理科大学 基礎工学部 片岡研究室 坂井正宗さんには、分子軌道計算上のアドバイスをいただきました。ここに感謝いたします。本学 生命理工学部 関根研究室 川原 さんには、計算化学の実際について、御教示いただきました。ここに感謝いたします。

筆者と同期で研究室へやって来て、互いに助け合い、刺激があった宮田省二氏、山田恵造氏に深く感謝いたします。小濱純氏には、本論文作製上の多大なるサポートをしていただきました。ここに深く感謝いたします。本研究を行

なうにあたり、多くの参考になる批判、討論をしていただきました徳田・大坂研究室の皆様にご心から感謝いたします。論文のタイプ打ちのみならず、いつもあたたかく接してくださいました前田事務官に感謝いたします。

最後に、9年間にわたる筆者の学生生活および研究生活を経済的・精神的に支えてくれた筆者の両親と家族に対してここに感謝します。