

2019年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

カプサイシンの電気化学分析

氏名

鹿川カイ

指導教員

横山憲二

キーワード：サイクリックボルタンメトリー、微分パルスボルタンメトリー、逆相 HPLC

【はじめに】唐辛子の辛みは7種類あるカプシノイドに由来しており、主成分はカプサイシンである。従って、カプサイシンを定量すれば、食品の辛さを数値化できると考えられる。カプサイシンは疎水性が高く、その分析は一般的に逆相HPLC法で行われるが、時間がかかる、高価で大がかりな装置、高度な分析技術が必要であるなどの問題点がある。一方、カプサイシンは電気化学活性を有することがわかっている。そこで本研究では、食品などの混合物試料から、電気化学分析法を駆使して、簡便、選択的にカプサイシンを検出、定量することを目的とする。

【実験方法】カプサイシンをアセトニトリル：緩衝溶液(pH7.0、pH4.4、またはpH2.0) = 1 : 1の混合溶液に溶解させ、サイクリックボルタンメトリー(CV)、微分パルスボルタンメトリー(DPV)を行った。また、逆相HPLC電気化学検出法により、カプサイシンの分析を行った。電気化学検出器は、上流のECD1を500 mV、下流のECD2を-500 mVに設定した。

【結果・考察】カプサイシンの CV を pH7.0 で行ったが、酸化電流しか観測されなかった。一方、逆相 HPLC 分析を pH4.4 の緩衝溶液を用いて行ったところ、酸化電流だけでなく、還元電流も測定することができた。そこで緩衝溶液の pH を変えて CV を行ったところ、酸性緩衝溶液中では、還元電流を観測することができた。また、DPV を行ったところ、低い pH では、明瞭なカプサイシンの還元ピークが見られた。ピーク電位は、pH 依存性があることも分かった。

■上記内容の公開に同意します

←同意する場合は、□を■に変更してください

2019 年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

還元型アルブミンの電気化学分析

氏名

大崎雄太

指導教員

横山憲二

キーワード：SH 定量、DTNB、メディエーター、フェロセン、サイクリックボルタンメトリー

1. はじめに

糖尿病、がん、循環器系疾患などの生活習慣病やその合併症に酸化ストレスが関与しており、その結果として、酸化型アルブミンが増加することが報告されている。そこで本研究では、SH 定量法とメディエーターを用いた電気化学分析法を組み合わせることにより、高感度で簡便な還元型アルブミンの電気化学分析法を開発した。

2. 実験方法

・分光光学的分析法

ウシ血清アルブミン (BSA) に含まれる還元型システイン (35 個の Cys 残基のうち、還元型は 1 個) を 5,5' -ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) を用いて、反応生成物である 5-メルカプト-2-ニトロ安息香酸 (MNB) を 412 nm の吸光度を測定することにより分析した。

・電気化学分析法

フェロセニルメチルトリメチルアンモニウム過ヨウ素酸塩をメディエーターとする触媒電気化学反応を用いて、アミノ酸のシステインまたは BSA と DTNB の反応で生成する MNB をサイクリックボルタンメトリー (CV) により測定した。

3. 結果と考察

DTNB を用い、分光光学的に BSA 中の還元型システインの割合を測定したところ、1 分子当たり還元型システインは 75%であることがわかった。次にシステイン、DTNB の反応溶液の CV を行ったところ、濃度依存性は確認されたが、十分に大きな電流は確認されなかった。BSA の場合も同様であった。次にシステインまたは BSA と DTNB の反応溶液にフェロセン誘導体を添加し、CV を行ったところ、大きな電流値の増加が確認された。MNB がフェロセン誘導体により、触媒的に電気化学酸化されたためであると考えられる。

上記内容の公開に同意します

←同意する場合は、をに変更してください

2019 年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

美白化粧品成分アスコルビルリン酸のイオンペア HPLC 分析

氏名

佐藤舞委

指導教員

横山憲二

キーワード：パルミチン酸アスコルビルリン酸 Na、APPS、リン酸二水素テトラブチルアンモニウム

【はじめに】

アスコルビン酸は安定性が低いため、より安定性の高いリン酸エステル誘導体が美白化粧品に利用されるようになってきた。アスコルビン酸リン酸エステル誘導体の、 pK_a は低く、HPLC 分析における移動相に用いる pH 範囲では解離しているため、C18 などの疎水性固定相への保持が弱くなる。そこで、電荷が中和され、疎水性にすることができるイオンペア試薬を添加することで対イオンを形成させ、十分にカラムに保持させることを考えた。本研究では、パルミチン酸アスコルビルリン酸 Na(APPS)のイオンペア HPLC 分析を行った。

【実験方法】

逆相 HPLC 分析は以下の条件で行った。すなわち、C18 カラム、溶離液はリン酸緩衝液(0.1 M, pH5.8)：アセトニトリル=90：10、イオンペア試薬・リン酸二水素テトラブチルアンモニウム(10 mM)を含むものを用いた。UV 検出器の波長は 240 nmとした。実サンプルとして、ドクターシーラボ VC100 エッセンスローションを用い、ろ過後、溶離液で希釈して HPLC 分析を行った。

【結果と考察】

まずイオンペア試薬を含まない溶離液を用いたところ、APPS はほとんどカラムに保持されないことがわかった。次にイオンペア試薬を添加し HPLC 分析したところ、6.5 分の溶出時間で APPS を検出することができた。次に APPS について、クロマトグラムピーク面積から濃度範囲 0~1.0 mg/mL の検量線を作成した。この検量線を用いて、VC100 エッセンスローション中の APPS 含有量を調べたところ、0.57 mg/mL であることがわかった。

■上記内容の公開に同意します

←同意する場合は、□を■に変更してください

2019年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

UVA 吸収剤ジエチルアミノヒドロキシベンゾイル
安息香酸ヘキシルの HPLC 分析と安定性の評価

氏名

周東里奈

指導教員

横山憲二

キーワード:UVA 吸収剤、1-(4-tert-butylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1,3-propanedione (BMB)、逆相 HPLC

【1. はじめに】

近年、紫外線 (UV) の悪影響を防ぐため、さまざまな UV ケア化粧品が製品化されている。しかし、市販されている UV 吸収剤においても、十分な安定性があるとは言えないことがわかってきた。本研究では、UVA 吸収剤として、最近利用頻度が増加しているジエチルアミノヒドロキシベンゾイル安息香酸ヘキシル (DHHB) について、C18 カラムを用いた逆相 HPLC 分析を行った。また、UVA 照射前後の DHHB を吸光度測定し、さらに他の UVA 吸収剤 1-(4-tert-butylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1,3-propanedione (BMB) と比較することにより、UVA に対する安定性の評価を行った。

【2. 実験方法】

DHHB の逆相 HPLC 分析について、UV 検出器を用いて移動相の条件を検討した。また、様々な濃度の DHHB サンプルを調製し、HPLC 分析によって得られたピーク面積をもとに検量線を作成し、それを用いて3種類の UV ケア化粧品の DHHB 含有量を調べた。さらに、DHHB サンプルに実際の太陽光線の約 1/2 の強度で UVA を 0~24 時間照射し、UVA 照射による DHHB の安定性を調べた。安定性の評価は、UVA の吸光度測定で行い、BMB と比較した。

【3. 結果と考察】

DHHB の HPLC 分析において条件を検討した結果、DHHB は疎水性が高く、溶離液は 75%アセトニトリルが適切だとわかった。また、作成した検量線をもとに UV ケア化粧品の DHHB 含有量を調べた結果、ANESSA は 1.4%、Biore UV は 1.6%、SKIN AQUA は 0.94%であることがわかった。さらに、DHHB に UVA を照射し、安定性評価を行った結果、DHHB はほとんど減少しなかった。一方、BMB が 24 時間で 53%に減少した。

上記内容の公開に同意します

←同意する場合は、をに変更してください

2019年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

γ -アミノ酪酸のラベル化反応の検討と HPLC 電気化学分析

氏名

竹村 彩

指導教員

横山 憲二

キーワード：GABA、フェロセンカルボン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、1-アミノ-2-プロパノール、電気化学ラベル化、電気化学検出

【はじめに】

γ -アミノ酸(GABA)はタンパク質を構成しない水溶性のアミノ酸の一種であり、高等動物の体内では神経抑制性伝達物質として働く。GABA はそのままでは電気化学活性がなく、ベンゼン環を持たないため電気化学検出器やUV 検出器などを用いた検出が不可能である。そこで本研究では、高い電気化学活性と高い酸化還元の安定性を有するフェロセンカルボン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(FcNHS)をラベル化剤として用い、GABA のラベル化を行った後、HPLC 電気化学分析を行った。特に、GABA のラベル化反応の最適条件について検討した。

【実験方法】

GABA と FcNHS のモル比を 1 : 2 でそれぞれリン酸緩衝液(pH8.0)5 mL とジメチルスルホキシド 5 mL に溶解させ混合し、50°Cで 120 分反応させ、GABA のラベル化を行った。反応後の溶液を適宜リン酸緩衝液(pH2.0)で希釈し、逆相 HPLC 分析を行った。また、反応停止剤として1-アミノ-2-プロパノール用い、反応時間後にそれぞれ 20 μ L 添加した。反応温度 50°Cと室温 24°Cについて、また反応時間 120 分以下についてラベル化反応の検討を行った。

【結果と考察】

HPLC 測定の結果より、溶出時間約 5.8 分、8.7 分、11 分にピークが見られた。このうち 5.8 分のピークはラベル化生成物 FcGABA のピークであると考えられた。このピークの面積は、GABA 濃度依存性が確認できた。反応温度については、室温 24°Cの場合においても、FcGABA の生成が確認されたが、反応後の溶液に沈殿が見られ、再現性も低かったため、反応温度としては 50°Cが良いと考えた。また、反応時間について検討したところ、反応時間 5 分の時点からすでに大きなピークが見られ、20 分から 25 分で最大のピークに達することが分かった。

上記内容の公開に同意します

←同意する場合は、をに変更してください

2019年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

オルニチンのラベル化と HPLC 電気化学分析

氏名

吉川巧馬

指導教員

横山憲二

キーワード：オルニチン、リシン、フェロセンカルボン酸-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル、逆相 HPLC、電気化学検出器

【はじめに】

オルニチン、リシンは、側鎖にアミノ基を有するが、UV 吸収や電気化学活性がないため、HPLC 分析で検出するためには、ラベル化する必要がある。本研究では、フェロセンカルボン酸-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル (FcNHS) を用いてラベル化反応を行い、HPLC 電気化学分析を行った。また、ギリシャフェタチーズに含まれるオルニチン、リシンの分析を行うことを目的とした。

【実験方法】

1. リン酸緩衝溶液 (0.1 M、pH8.0) に溶解したオルニチン(混合後の濃度 $0 \sim 4.7 \times 10^{-3}$ mol/L)と、ジメチルスルホキシドに溶解した FcNHS (1.9×10^{-2} mol/L)を 3:1 で混合し、50°C、120 分間、ラベル化反応を行った
2. HPLC 分析は、固定相を C18 カラム、移動相をアセトニトリル、リン酸緩衝水溶液 (0.1 M、pH2.0) を用いて、混合比 1:4 で行った。電気化学検出器は ECD1 (上流) 300 mV、ECD2 (下流) -300 mV、UV 検出器は波長 263 nm に設定して測定した。

【結果と考察】

HPLC 電気化学分析を行ったところ、オルニチンは約 4 分、5 分に、リシンは約 4.5 分、5.5 分にピークが検出された。オルニチン、リシンは主鎖と側鎖にアミノ基を持つので、3つのラベル化物が得られる可能性があるが、今回はそのうち2つが検出できた。また、ピーク面積をもとにそれぞれの検量線を作成したところ、オルニチン濃度とピーク面積が比例関係にあることがわかった。実サンプルとして、ギリシャフェタチーズについても同様の方法で測定を行い、オルニチン標準試料と同様の溶出時間にピークが確認できた。

■上記内容の公開に同意します

←同意する場合は、□を■に変更してください

2019年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

美白化粧品成分トラネキサム酸のラベル化と HPLC 電気化学分析

氏名

甲斐沙友里

指導教員

横山憲二教授

キーワード：トラネキサム酸、フェロセンカルボン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ラベル化反応、逆相 HPLC、電気化学検出器

【1. はじめに】 トラネキサム酸は人工合成されたアミノ酸の一種であり、メラニンを生成するメラノサイトの活性化の抑制と肌荒れ等の炎症反応を抑制する作用によってシミの生成を予防する効果が得られる。トラネキサム酸は、電気化学活性や UV 吸収がほとんどないため、HPLC により分析するには、蛍光物質や電気化学活性種などでラベル化することが必要になる。そこで本研究では、フェロセンカルボン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (FcNHS) をラベル化剤として使用し、ラベル化後、逆相 HPLC 電気化学検出法により定量分析を行った。

【2. 実験方法】 トラネキサム酸(混合後の濃度 0~0.65 mg/ml)と FcNHS (4.15 mg/ml)を 50°C、120 分間リン酸緩衝溶液 (0.1 M, pH8.0):ジメチルスルホキシド(4:1)混合溶液中で反応させ、トラネキサム酸のラベル化反応を行った。反応後の溶液を 10 倍希釈し、移動相にアセトニトリル:リン酸緩衝溶液(0.1 M, pH2.0) (3:7)を使用、電気化学検出器 ECD1 (300 mV)、ECD2 (-300 mV)、UV 検出器 (263 nm) の条件下で逆相 HPLC 分析を行った。また、化粧水、乳液に含まれているトラネキサム酸についても同様の条件でラベル化反応、逆相 HPLC 分析を行った。

【3. 結果と考察】 ラベル化反応後の溶液を HPLC 分析したところ、各検出器で溶出時間 8, 10, 12~13 分にピークが見られた。12~13 分のピークはトラネキサム酸濃度依存性があるため、このピークがフェロセンラベル化トラネキサム酸であると考えられる。また、このピーク面積を用いてトラネキサム酸に対する検量線を作成すると、トラネキサム酸濃度 0~0.65 mg/ml で直線関係が見られた。さらに、この検量線を用いて化粧水、乳液中のトラネキサム酸含有量を決定することができた。

■上記内容の公開に同意します

←同意する場合は、□を■に変更してください

2019 年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

アミノ酸系界面活性剤のラベル化反応と HPLC 電気化学分析

氏名

原田ちひろ

指導教員

横山憲二

キーワード: N-ラウロイルサルコシナトリウム、カルボジイミド、ラベル化反応、電気化学検出器、逆相 HPLC

【はじめに】

アミノ酸系界面活性剤である N-ラウロイルサルコシナトリウムは、強い洗浄力等を持ち、シャンプーや洗顔料の洗浄成分として配合されている。N-ラウロイルサルコシンを HPLC で定量分析するには、N-ラウロイルサルコシンが強い UV 吸収を持たないことから蛍光物質や電気化学活性種によるラベル化が必要となる。そこで本研究では N-ラウロイルサルコシンのカルボキシル基を水溶性カルボジイミド (以下 WSC) で活性化後、N-ヒドロキシスクタミンイミド (NHS) エステルを介し、アミノ基を有するフェロセンと縮合反応を行った。反応生成物は C18 カラムを用いた逆相 HPLC 電気化学検出法により分析した。

【実験方法】

N-ラウロイルサルコシン Na と WSC、NHS をリン酸緩衝溶液 (0.1M、pH5.8) で溶かし、氷冷にて 60 分間反応させた。これにテトラヒドロフラン・リン酸緩衝溶液 (0.1M、pH8.0) に溶かした (Hydrazinocarbonyl) ferrocene を添加し、4°C で一晚反応させた。市販のシャンプーについても同条件でラベル化反応を行った。HPLC 分析の条件は、C18 カラム、溶離液はリン酸緩衝溶液 (0.1M、pH5.8) ・アセトニトリル混合溶液 (主に 40:60)、上流の電気化学検出器 ECD1:300mV、下流 ECD2:-300mV、UV 吸収波長 263nm とし、反応溶液は希釈せず、原液を用いて HPLC 分析を行った。

【結果と考察】

ラベル化反応溶液を HPLC 分析すると、電気化学検出器で約 13~14 分にピークが確認できた。このピークには濃度依存性もあり、フェロセンラベル化 N-ラウロイルサルコシンであると考察した。このピーク面積を用いて検量線を作成したところ、比例関係が見られた。市販のシャンプーにおいてもラベル化と HPLC 分析ができ、シャンプーの N-ラウロイルサルコシン Na の含有量を測定することが可能となった。

■上記内容の公開に同意します

←同意する場合は、□を■に変更してください

2019 年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

カルボン酸のラベル化反応の検討と HPLC 電気化学分析

氏名

宮川拓也

指導教員

横山憲二

キーワード: グルクロン酸、カルボキシル基、ラベル化反応、カルボジイミド、逆相 HPLC

[はじめに]

カルボキシル基には UV 吸収がほとんどなく、電気化学活性もないため、カルボン酸化合物を HPLC で検出するためには、ラベル化する必要がある。本研究では、カルボン酸(3-ヒドロキシ酪酸、グルクロン酸)をアミノ基を有するフェロセン誘導体でラベル化する際の反応温度、水溶性カルボジイミド (WSC) の添加量、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) の添加効果などを検討した。またラベル化反応生成物の逆相 HPLC におけるピークを特定するため、カルボン酸の濃度依存性、移動相のアセトニトリル濃度について検討した。

[実験方法]

カルボキシル基を有する単糖グルクロン酸 0.016 mol リン酸緩衝液(0.1 M, pH5.8) 1.0 mL に溶かした溶液①、WSC 0.48 mol、NHS 0.048 mol をリン酸緩衝液(pH5.8) 1.5 mL に溶かした溶液②を調製後、溶液①と②を混合して氷浴中で 1 時間反応させ、カルボキシル基の活性化を行った。また (Hydrazinocarbonyl)ferrocene 0.048 mol、テトラヒドロフラン 2.5 mL、リン酸緩衝液(0.1 M, pH8.0) 7.5 mL 加えた溶液③を調製した。次に①と②の反応溶液に③を添加し、4 °Cで一晩攪拌して反応させ、フェロセンラベル化グルクロン酸を合成した。反応後は 4 °Cで保存し、逆相 HPLC を用いてラベル化グルクロン酸の分析を行った。HPLC の検出器は、電気化学検出器(上流:300mV、下流-300mV)で測定した。

[結果と考察]

グルクロン酸のラベル化反応では、副生成物が多く、最初はラベル化グルクロン酸のピークを見つけることができなかった。しかし、氷冷下、グルクロン酸に対し WSC を 30 当量で反応させたとき、また、逆相 HPLC 分析の移動相のアセトニトリル濃度を 10%としたとき、ラベル化グルクロン酸のピークを確認することができた。さらに、グルクロン酸濃度依存性も確認することができた。

■上記内容の公開に同意します

←同意する場合は、□を■に変更してください