

2020 年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

メディエーター反応を利用した還元型アルブミンの電気化学分析

氏名

大庭誠太郎

指導教員

横山憲二

キーワード: システイン、DTNB、Bis(2-hydroxyethyl)disulfide (HES₂)、メディエーター、サイクリックボルタンメトリー、BSA

【はじめに】

癌や糖尿病、循環器系疾患などの原因に酸化ストレスが関与していることが報告されている。人体が酸化ストレスにさらされると、血中酸化型アルブミンの割合が増加することが知られており、特に腎疾患の患者に増加傾向が顕著に表れることが判明している。血液透析にて、オンラインで還元型/酸化型アルブミン量を測定するシステムを構築することを最終目的とし、本研究では、還元型アルブミンを簡便に測定できる電気化学分析法に着目した。

【実験方法】

金電極（作用電極）、金コイル（対極）、銀・塩化銀電極（参照電極）を用いて L-システイン (cys) やウシ血清アルブミン (BSA)、および 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)、Bis(2-hydroxyethyl)disulfide (HES₂) などのジスルフィド結合化合物、さらにこれらの反応生成物をサイクリックボルタンメトリー (CV) によって測定した。また、生成する SH 化合物を電解酸化する際のメディエーターである Dodecyl(ferrocenylmethyl)dimethylammonium (DFDA) を用いた場合について検討した。また、陽イオン交換樹脂であるナフイオン膜を用いることにより、電極上にメディエーターを固定化した。

【結果と考察】

ナフイオン膜を用いてメディエーターを固定化し、繰り返し CV を行ったところ、再現性のある酸化還元電流が見られた。次に cys の測定では、メディエーターを用いることで電流値が増幅するが、cys 濃度により酸化電位がシフトするなどの現象が見られた。DTNB または HES₂ を介した cys の酸化について CV を行った。その結果、DTNB を用いた場合では、電流値の増幅は確認されなかったが、HES₂ の場合では電流値の増幅を確認するできた。すなわち、HES₂ を用いた電気化学分析法により、還元型 BSA の定量の可能性が示された。

2020年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

コウジ酸の電気化学分析

氏名

渋谷宙志

指導教員

横山憲二

キーワード：コウジ酸、電気化学分析、メディエーター、ナフィオン

【はじめに】

コウジ酸とは、麴から発見された有機化合物であり、チロシナーゼの活性中心である銅イオンを除去する作用を持ち、メラニン合成を阻害することから美白化粧品に用いられている。本研究では、簡便な電気化学分析法を用いてコウジ酸を測定することを目的とする。コウジ酸は電気化学的に活性があるが、電子伝達メディエーターを用いることにより、低い電位で高感度に検出が可能であると考えられる。また、電子伝達メディエーターを電極に固定化することにより、より簡便に繰り返し測定を行うことが可能であると考えられる。

【実験方法】

コウジ酸をリン酸緩衝液(0.1M、pH2.0または、7.0)に溶解させ、作用電極に直径1mm円板状金電極を用い、三電極方式でサイクリックボルタンメトリー(CV)を行った。電子伝達メディエーターにはフェロセニルメチルドデシルジメチルアンモニウム過塩素酸塩(FMDDMA)、フェロセニルメチルトリメチルアンモニウム過塩素酸塩(FMTMA)の2種類を用いた。また、疎水性の高い陽イオンのFMDDMAを電極に固定化する際に陽イオン交換樹脂ナフィオンを用いた。

【結果と考察】

コウジ酸のCVを行ったところ、pH7.0ではコウジ酸を含まない溶液と比較して高い電流値を確認できたが、pH2.0では確認できなかった。また、メディエーターをリン酸緩衝液に溶解させて用いることにより、更に高い電流値を確認することができた。しかし、ナフィオンを用いFMDDMAを固定化した電極を用いた際は、電流値の増幅は確認できなかった。

【結論】

電子伝達メディエーターを用いることにより、コウジ酸のより高感度な検出が可能であると示され、得られた電流値からFMDDMAの方が適していることがわかった。

2020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

野沢晟綺

指導教員

横山憲二

キーワード：カプサイシン、再還元反応、リニアスイープボルタンメトリー

【はじめに】

カプサイシンとはバニリルアミンと脂肪酸がアミド結合したカプサイシノイドでアルカロイドの一種である。カプサイシンは一般的に HPLC で分析されている。しかし、HPLC には装置が高価、高い分析技術や時間が必要など問題点がある。また、カプサイシンは電気化学活性を有しているため、電気化学分析での測定が可能である。カプサイシンの電気化学分析では通常、酸化電流を測定するが、混合溶液中の酸化されやすい物質の影響を受ける問題点がある。そこで本研究では、酸化されやすい物質の影響を減少させるため、カプサイシンを一度サッβ化させた後、再還元反応させ、その還元電流の測定を行った。電気化学分析法として、リニアスイープボルタンメトリー (LSV) を用いた。

【実験方法】

電気化学分析は 3 電極法で行い、作用電極には直径 1mm 円板状金電極を用いた。種々の濃度のカプサイシン溶液 (0.1M リン酸緩衝液 (pH2.0) : アセトニトリルの混合溶液=1:1) を調製し、測定範囲-0.5 V~1.0 V、待機時間 30 秒、掃引速度 50 mV/s で LSV を行った。また、初電位を 0.6 V~1.2 V、待機時間 20 秒~60 秒に変化させ、カプサイシンの還元電流値に及ぼす影響を調べた。

【結果と考察】

カプサイシンの LSV を行ったところ、上記のすべての条件で還元電流を確認することができた。還元電流値とカプサイシン濃度に相関関係が見られたため、未知濃度のカプサイシンの分析が可能であると考えられた。待機時間の検討では、上記のすべての待機時間で十分な還元電流を確認することができた。

2020年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

コウジ酸の HPLC 電気化学分析

氏名

水野綾香

指導教員

横山憲二

キーワード：コウジ酸、硝酸鉄(Ⅲ)、キレート反応、逆相 HPLC、電気化学検出器

【はじめに】コウジ酸は麹菌の発酵液から分離・精製された天然由来成分であり、メラニン生成を阻害するチロシナーゼの活性阻害作用、終末糖化産物 AGEs の発生を抑制する抗糖化作用、抗菌作用を持つことで知られている。そのため、現在では医薬部外品における美白成分として使用されている。本研究では、電気化学検出器を用いてコウジ酸の HPLC 分析を行った。また、コウジ酸・金属イオン錯体を形成させ、これを測定することにより、コウジ酸をさらに高感度で検出・定量することを目的とした。

【実験方法】1.0 $\mu\text{g/mL}$ のコウジ酸標準溶液について逆相 HPLC 分析を行い、コウジ酸の電位依存性を検証した(条件：C18 カラム・0.1 M, pH4.4 酢酸緩衝液とアセトニトリル(97:3)の溶離液、ECD1:300 mV~700 mV)。また、0~1 $\mu\text{g/mL}$ のコウジ酸溶液を調製し、ECD1:550 mV で逆相 HPLC 分析を行い、その結果を元に検量線を作成した。次に検量線から美容液(ONE BY KOSE メラノショットホワイト D)のコウジ酸含有量を調べた。さらに、硝酸鉄(Ⅲ)を用いて鉄・コウジ酸複合体を形成させ、吸光度測定と HPLC 分析を行った(条件：0.1 M, pH2.0 リン酸緩衝液とアセトニトリル(97:3)、ECD1:-450 mV、ECD2:350 mV)。コウジ酸溶液に硝酸鉄(Ⅲ)を添加したときの Fe^{3+} の還元電流(ECD1)および酸化電流(ECD2)のピーク面積の変化を調べた。

【結果と考察】コウジ酸の HPLC 分析結果から、溶出時間 4.06 分にコウジ酸の酸化ピークが見られることが分かった。また、作成した検量線からコウジ酸濃度 0 ~1 $\mu\text{g/mL}$ においてコウジ酸濃度依存性が確認された。また電気化学検出器 ECD1 の電位が 450 mV 以上で酸化電流が見られるようになり、電位依存性が確認された。検量線を用いて、美容液中のコウジ酸含有量を測定した結果、0.40%であることが分かった。さらに、硝酸鉄(Ⅲ)とコウジ酸を混合すると、赤褐色に呈色したことから、 Fe^{3+} ・コウジ酸複合体が生成したと確認できた。 Fe^{3+} の溶出時間 1.65 分において、硝酸鉄(Ⅲ)・コウジ酸の両方が含まれているサンプルの場合、硝酸鉄(Ⅲ)だけのサンプルと比べ、高いピーク電流値が見られた。 Fe^{3+} ・コウジ酸複合体が形成されたためであると考えられる。

2020 年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

カプサイシンの再還元反応を利用した HPLC 電気化学分析

氏名

村上陽次郎

指導教員

横山憲二

キーワード：カプサイシン，逆相 HPLC 電気化学分析，再還元反応

【はじめに】

唐辛子の辛味成分であるカプサイシンの分析は、通常、逆相 HPLC 法で行われる。また、UV 吸収だけでなく、電気化学活性を持っているので、電気化学検出器を用いることにより高感度な測定が可能となる。当研究室では、HPLC 電気化学検出器において、電解酸化反応によって検出することが一般的であるカプサイシンを再還元反応により検出することが有効であると考えている。すなわち、本研究では、カプサイシンを一旦電解酸化し、その後還元して、還元電流値により定量する。すなわち、検出器の設定電位、移動相の pH を最適化するなど HPLC 電気化学分析の条件を検討した。

【実験方法】

カプサイシンの HPLC 電気化学分析は、固定相に C18 カラム、移動相に 0.1 M, pH4.4 の酢酸緩衝溶液 55%とアセトニトリル 45%の混合溶液を用いて行った。移動相の pH を 2.0、7.0 としたときは、0.1 M リン酸緩衝溶液を用いた。電気化学検出器の設定電位は、上流の ECD1 を 200～600 mV、下流の ECD2 を -200～-700 mV とし、最適条件を検討した。

【結果と考察】

設定電位の条件を検討した結果、ECD1 の電位が 400 mV 以上で最大の酸化ピーク面積が得られた。また、ECD2 の電位が -400 mV 以下で最大の還元ピーク面積が得られた。次に、移動相の pH を変化させて検討を行ったところ、pH2.0～pH7.0 において、ピーク面積の差異はほとんど見られなかった。本研究により、カプサイシンを電気化学分析する際、再還元電流値をもとに定量することが有効であることが示された。

2020年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

HPLC プレカラム法による有機酸分析法の確立

氏名

松村純怜

指導教員

横山憲二

キーワード：有機酸、HPLC、フェロセンカルボヒドラジン

【はじめに】現在、HPLC を用いた有機酸の主流な分析法は、サンプルをカラムで分離した後にラベル化して検出するポストカラム法である。この方法は分析中にラベル化試薬を常に流しておく必要があるため、試薬の消費量が多く、pKa にも制限があり、また高感度分析が難しいなど多くのデメリットがある。そこで本研究では、これらのデメリットがなく、高感度に分析することができるプレカラム法を用いた有機酸分析法を確立することを目的とした。本研究では、有機酸として乳酸を用いることとした。先行研究より、カルボキシル基を持つ N-ラウロイルサルコシンのフェロセンカルボヒドラジン (FcNH_2) によるラベル化が確立されているため、このラベル化法を用いて乳酸をラベル化することを検討した。

【実験方法】N-ラウロイルサルコシンもしくは乳酸を 0.1M リン酸緩衝液 (pH5.8) で溶解し、カルボジイミドと N-ヒドロキシスクシイミドを 0.1M 酸緩衝液 (pH5.8) で溶解したものと混合し、氷冷化で 60 分間反応させた。これに、 FcNH_2 をテトラヒドロフランもしくはメタノールと、0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0) で溶解したものを添加し、4°C で一晩反応させた後、HPLC で分析を行った。

【結果と考察】先行研究の再現性を確認したところ、N-ラウロイルサルコシンと思われるピークが、先行研究と同様の検出時間で確認できた。そこで、同様の方法で乳酸をラベル化し、様々な条件で HPLC 分析を行ったが、ラベル化された乳酸と思われるピークを検出することは出来なかった。そこで、飛行時間化型質量分析計 (TOF-MS) を用いてラベル化された N-ラウロイルサルコシンや乳酸があるかを確認したところ、両者とも確認することができなかった。以上の結果より、 FcNH_2 を用いたカルボキシル基のラベル化方法は今後も検討していく必要があると考える。

2020年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

HPLCによるリゾレシチン分析法の確立

氏名

今井優汰

指導教員

横山憲二

キーワード : LysoPC、PNBC、HPLC、ラベル化

【はじめに】

リゾレシチン(LysoPC)は、レシチンの1位もしくは2位のアシル基が外れたものである。その生理作用は、多様であることが分かっているが、炎症を増進する作用が特に注目されている。現在、LysoPCの主流な測定法は液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS)であるが、LC/MS自体が高価で、また技術を要するため、一般性が高いとは言えない。そこで本研究では、HPLCによる簡易的なLysoPC分析法を確立することを目的とした。また、アシル基の種類ごとに精製されたLysoPCの標準品は高価であるため、卵黄由来リゾレシチンからの精製法も確立することとした。

【実験方法】

リゾレシチンの精製では、卵黄由来リゾレシチンをメタノールで溶解し、分取用液体クロマトグラフを用いて分取を行った。その後、分取した各溶液を飛行時間化型質量分析計(TOF-MS)を用いて同定し、精製を行った。

リゾレシチンのラベル化では、p-Nitrobenzoyl chloride(PNBC)をラベル化剤として用い、Schotten-Baumann反応を基にラベル化法の検討を行った。

【結果と考察】

卵黄由来リゾレシチンを分離し、分取したものをTOF-MSで分析したところ、16:0、16:1、18:0、18:1 LysoPCが検出された。その後、溶媒を除去し、精製した16:0、18:0 LysoPCをTOF-MSで分析したところ、固有のマスペクトルが確認できたため、16:0、18:0 LysoPCの精製法が確立できたと考える。また、16:0 LysoPCの標準品を用いてPNBCでラベル化を行ったところ、ブランクには見られないピークが確認できた。そこで、濃度が異なる16:0 LysoPCをラベル化し、ピーク面積と濃度の関係を確認したところ、16:0 LysoPCの濃度に依存してピーク面積が増加することが確認できた。

2020年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

リボフラビンによるキノン類の還元

氏名

中野真衣

指導教員

横山憲二

キーワード：キノン類、リボフラビン、HPLC

【はじめに】キノン類とは、芳香族炭素骨格の2つの炭素上のメチン基をカルボニル基に置き換えたカルボニル化合物の総称である。このようなキノンを構造に持つキノン系化合物は、生体内で代謝される際、NAD(P)H:キノン酸化還元酵素1 (NQR1) によって2電子還元されて代謝されると考えられている。代謝の際には、補酵素であるフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)が必要であることも知られており、これらは補因子として反応に関与している。しかし先行研究により、フラビン類単体でもキノン類が還元されることが明らかとなっている。そこで、本研究では、フラビン類単体によるキノン類の還元作用を確認し、その生理的意義を明らかとすることを目的とした。先行研究によって、キノン骨格を持つコエンザイム Q10 (CoQ10) がリボフラビンによって還元されることが明らかとされていたため、まずはリボフラビン類の1つである、フラビンモノヌクレオチド (FMN) による CoQ10 の還元作用の再現性を確認した。

【実験方法】CoQ10 と水素供給源として NADH、FMN の濃度を 5:500:1 の割合で調製し、37°C でインキュベートを行った。その後、30 分おきに 120 分間サンプルを採取し、2-プロパノールで CoQ10 を抽出後、HPLC で分析を行った。

【結果と考察】先行研究と同様に、CoQ10:NADH:FMN=5:500:1 の割合で調製し、スターラーで攪拌しながら 37°C でインキュベートしたところ、数 μM の減少はみられたが、先行研究と同様の結果は得られなかった。そこで、FMN 濃度を 2.5 倍にし、スターラーでの攪拌ではなく、恒温水浴中でインキュベートしたところ、先行研究と同様の還元量まではいかないが、CoQ10 が還元された。そのため、反応条件などを再度検討する必要があることが分かった。条件が決定したのち、抗酸化フラボノールとして知られており、キノン基を持つケルセチンに対しても、FMN による還元作用があるかを確認する予定である。

2020年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

酵素反応における活性酸素の影響

氏名

野口浩樹

指導教員

横山憲二

キーワード：活性酸素、酵素反応、 β -ガラクトシダーゼ、ラジカル、一重項酸素

【はじめに】

活性酸素とは、酸化に関与する酸素種の総称であるが、狭義の意味ではスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素の4つのことを指す。生体内では活性酸素によって様々な傷害が起こることが明らかにされている。酵素活性においても、活性酸素によって低下すると言われているが、活性酸素種の種類によって酵素反応にどのような影響を与えるかなど、詳しいことはほとんど調べられていない。そこで本研究では、 β -ガラクトシダーゼを用いた酵素反応系で、活性酸素種による酵素活性の影響を検討した。

【実験方法】

o -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG) を基質として、 o -ニトロフェノールと β -D-ガラクトシドを生成する、 β -ガラクトシダーゼを用いて実験を行った。反応における酵素濃度と反応時間を決定した後、同様の条件下で、水溶性ラジカル開始剤である、2,2'-アゾビス (2-メチルプロピオンアミジン) 二塩酸塩 (V-50) と、一重項酸素発生試薬 (EP 試薬) を阻害剤として用いて、様々な基質濃度での酵素反応を行った。生成された o -ニトロフェノールは、紫外可視分光光度計を用いて、410 nm における吸光度を測定して定量を行った。

【結果と考察】

V-50 を様々な濃度で添加したところ、10 mM では阻害は起こらなかったが、それ以外の濃度では阻害が見られた。これらの結果から、ラインウィーバー＝バークプロットを作成したところ、V-50 による阻害様式は非拮抗的阻害であると考えられる。また、一重項酸素による阻害様式を確認し、活性酸素種による阻害の差があるのかを確認する予定である。

2020年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

ボロン酸エステル形成を利用した糖の HPLC 電気化学分析

氏名

長谷川匠

指導教員

横山憲二

キーワード：糖類、ジオール化合物、フェロセンボロン酸、エステル、電気化学分析

【はじめに】糖類は、UV 吸収や電気化学活性がないため、HPLC 分析をする際に感度が低い示差屈折率検出器を使用せざるを得ない。そのため高感度に糖類を検出するには、ラベル化が考えられるが、糖類のヒドロキシ基の反応性を考えるとアミノ基を用いたラベル化ほど容易ではない。一方、グルコースなどのジオール化合物はボロン酸誘導体と可逆的なエステルを簡単に形成することが知られている。本研究では、フェロセンボロン酸を用い、糖類とエステル複合体を形成させ、糖類の HPLC 電気化学分析を行った。

【実験方法】フェロセンボロン酸、グルコース、およびこれらの混合溶液の逆相 HPLC 分析を行った。HPLC 分析はカラムを C18 カラム、溶離液をリン酸緩衝液：アセトニトリル=7：3、電気化学検出器、UV 検出器、示差屈折率検出器を用いて測定を行った。

【結果と考察】電気化学検出器の電位を ECD1:300 mV、ECD2:-300 mV に設定し、フェロセンボロン酸の HPLC を行ったところ、8.42 分に溶出のピークを得ることができた。しかし、フェロセンボロン酸・グルコース混合溶液を測定したところ、明確な違いは見られなかった。次に、ECD1:0 V、ECD2:-300 mV に設定し、グルコースの代わりに UV 吸収を持つ 4-ニトロフェニルグルコピラシド(NPG)を用いて HPLC 分析を行ったところ、フェロセンボロン酸だけでは 1500 nA だったピーク電流が NPG を混合した測定では、2000 nA を超えて振り切れる現象が確認された。原因の詳細は不明であるが、フェロセンボロン酸・NPG 複合体が形成され、酸化還元電位のシフトが起こったか、あるいは NPG がフェロセンボロン酸により、触媒的に酸化されたため電流値の増幅が見られたのかもしれない。

2020年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

酸性アミノ酸のラベル化反応と HPLC 電気化学分析

氏名

甘利一貴

指導教員

横山憲二

キーワード： アスパラギン酸、グルタミン酸、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、HPLC、電気化学検出器

【はじめに】

酸性アミノ酸にはアスパラギン酸 Asp とグルタミン酸 Glu の 2 種類があり、側鎖にカルボキシル基を持つことを特徴としている。Asp は主に体内のエネルギー源として使われやすく、Glu は旨味の素や興奮系の神経伝達物質として働く作用を持っているため様々な食品に使用されている。酸性アミノ酸は電気化学活性や UV 吸収をほとんど持たないため、HPLC 分析にはラベル化が必要になる。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) を用いてラベル化を行い、電気化学検出器を用いて HPLC 電気化学分析を行った。

【実験方法】

リン酸緩衝液 (pH8.0) に溶解させた Asp または Glu とジメチルスルホキシドに溶解させた FcNHS をモル比 1:4、50℃、120 分間反応させ、ラベル化反応を行った。

固定相を C18 カラム、移動相をアセトニトリル:リン酸緩衝液 (pH2.0)=1:3 (Asp)、1:4 (Glu) とし、HPLC 分析を行った。電気化学検出器 ECD1、ECD2 の電位は、それぞれ 300 mv、-300 mv に設定し、電流値を測定した。

【結果と考察】

HPLC 分析の結果より、ラベル化 Asp は 6.46 分 (アセトニトリル:リン酸緩衝液=1:3)、同 Glu は 17.65 分 (1:4) にピークが検出できた。次にピーク面積に対し Asp または Glu 濃度をプロットし、検量線を作成したところ、Asp は 0~0.166 mg/mL、Glu は 0~0.184 mg/mL に濃度依存性があった。また、アスパラガスの絞り汁に含まれる Asp 含有量を調べた。

2020年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

疎水性アミノ酸のラベル化反応と HPLC 電気化学分析

氏名

森大輝

指導教員

横山憲二

キーワード：ロイシン、イソロイシン、バリン、FcNHS、ラベル化反応、逆相 HPLC

【はじめに】

ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、バリン (Val) は、疎水性の必須アミノ酸である。これらのアミノ酸は、電気化学活性や UV 吸収がほとんどないため、HPLC 分析を行う際、電気化学検出器や UV 検出器などを用いた検出ができない。そこで本研究では、高い電気化学活性と酸化還元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) をアミノ基のラベル化剤として用い、電気化学検出器を用いた逆相 HPLC 分析を行った。

【実験方法】

疎水性アミノ酸 1.0×10^{-5} mol を 8.0 mL リン酸緩衝溶液 (0.1 M, pH8.0) に溶解させたものと FcNHS 4.0×10^{-5} mol を 2.0 mL ジメチルスルホキシドに溶解させたものを混合し、ウォーターバス内で 50°C、120 分間、ラベル化反応を行った。

固定相を C18、溶離液をアセトニトリル：リン酸緩衝水溶液 (0.1 M, pH2.0) 3:7 とした逆相 HPLC 分析により、ラベル化アミノ酸を測定した。電気化学検出器 ECD1 の電位を 300 mV、ECD2 を -300 mV、UV 検出器の波長 263 nm として測定した。

【結果と考察】

HPLC 測定より、ラベル化 Leu は 35.02 分に、同 Ile は 33.03 分に、同 val は 19.19 分にピークが検出された。また、Leu 濃度に対し、ピーク面積をプロットしたところ、Leu 濃度 0~0.99 mg/mL の範囲で比例関係にあることがわかった。構造異性体である Leu、Ile がそれぞれ分析可能であることが示された。

実サンプルとしてアミノ酸含有サプリメント (味の素株式会社) に含まれる疎水性アミノ酸の HPLC 測定を行ったところ、3つの疎水性アミノ酸に対し、それぞれの溶出時間にピークが検出された。また、サプリメントの Leu 含有量を検量線から決定した。

2020 年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

アルギニンのラベル化反応と HPLC 電気化学分析

氏名

吉田晴登

指導教員

横山憲二

キーワード：アルギニン、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

【はじめに】

アルギニンのなどの芳香族以外のアミノ酸は電気化学活性、UV 吸収がほとんどなく、HPLC 分析する場合、そのままでは電気化学検出器や UV 検出器を用いて検出できない。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) を用いてアルギニンのラベル化を行い、HPLC 電気化学分析を行った。また、アルギニンの濃度依存性、ラベル化反応時間依存性を調べた。以上の結果をもとにオルニチンサプリメント中のアルギニンの定量分析を行った。

【実験方法】

アルギニンをリン酸緩衝液 (pH8.0) に溶かした溶液、FcNHS をジメチルスルホキシドに溶かした溶液を混合し、ウォーターバスで 50°C、120 分間反応させた。その反応終了後、10 倍希釈、フィルターろ過した溶液の HPLC 分析を行った。HPLC 分析はカラムを C18 カラム、移動相をアセトニトリル：リン酸緩衝液 (pH2.0) = 2:8、電気化学検出器の電位を ECD1: 300 mV, ECD2: -300 mV、UV 検出器波長を 263 nm に設定した。

【結果と考察】

HPLC 分析により、Fc ラベル化アルギニンのピークが溶出時間 5.58 分に見られた。また、種々のアルギニン濃度で同様にラベル化、HPLC 分析を行い検量線を作成した結果、アルギニン濃度 0.004~0.174mg/mL で濃度とピーク面積の間に直性関係が見られた。次に種々のラベル化反応時間の影響を調べたところ、反応時間 5 分~120 分でピーク面積がラベル化反応時間に対して増加していることが確認できた。

2020年度 応用生物学部 卒業論文概要

論文題目

GABA の HPLC ラベル化反応の最適化

氏名

タン リ ルイ

指導教員

横山憲二

キーワード： GABA、逆相 HPLC、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、ラベル化反応

【はじめに】

GABA (γ -アミノ酪酸) は、哺乳動物の体内に存在する水溶性アミノ酸の一種である。GABA は主に脳や脊髄で抑制性の神経伝達物質として働くほか、血圧上昇抑制、リラククス、ストレス低減などの作用がある。GABA はベンゼン環や電気化学活性基を持たないアミノ酸のため、そのまま検出することは難しい。当研究室では、これまでに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) による GABA のラベル化と HPLC 分析を行ってきたが、ラベル化反応条件については、十分には検討されていない。そこで、本研究では、ラベル化反応の溶媒組成、温度、pH、時間などの最適化を行った。

【実験方法】

種々の pH の緩衝液 (pH8.0、pH8.7、pH11.0 リン酸緩衝液、pH10.0 炭酸緩衝液) において、FcNHS による GABA のラベル化反応 (120 分、50°C) を行った。反応生成物の分析は、リン酸緩衝液・アセトニトリルを移動相とする逆相 HPLC により行った。各 pH 緩衝液について、ラベル化反応の温度 (24°C、50°C) ・時間 (5 から 120 分間) について検討した。反応停止剤として 1-アミノ-2-プロパノールを使用した。

【結果と考察】

HPLC 測定の結果により、ラベル化反応に炭酸緩衝液を用いた場合でもラベル化 GABA は確認できたが、リン酸緩衝液を用いた場合のピーク面積の方が大きいことが分かった。リン酸緩衝液を用いた場合、pH8.7 がラベル化に最適な pH であった。なお、ラベル化反応温度を 24°C とした場合、未反応物または副生成物とラベル化 GABA の溶出ピークが重なり、分離が困難であった。50°C の場合には、この妨害物質のピークは消失した。