

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05181

研究課題名(和文) 酸・塩基性物質の電気化学検出法の分析対象をワイドレンジ化する研究とその応用

研究課題名(英文) Developments of novel electroanalytical methods for determining a wide range of acidic and basic compounds in real samples

研究代表者

小谷 明 (Kotani, Akira)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40318184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超強酸性物質、強塩基性物質、アミノ酸の新規電気化学分析法を開発した。超強酸性物質の検出にはアセトニトリル中でのビタミンK3のボルタンメトリーを、強塩基性物質とアミノ酸の検出には3,5-ジ-tert-ブチル-1,2-ベンゾキノンの電解還元に基づく酸測定法に中和逆滴定を組み合わせる方法を開発した。本研究により、酸・塩基性物質の電気化学検出法の分析対象を拡張することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従前、電気化学検出が困難であった超強酸性物質、強塩基性物質、アミノ酸の新規分析法を開発できた。これらの分析法は、有機分子触媒や燃料電池材料の評価、水中のアルカリ度測定などの環境分析、発酵食品の製造過程における品質管理へ応用可能である。各分野の計測技術として寄与する本研究成果は、学術的かつ社会的に意義のあるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Electroanalytical methods for determining weakly acidic and basic compounds have previously been proposed using reduction of quinone and oxidation of hydroquinone, respectively. In the present study, novel electroanalytical methods are provided for determining strongly acidic and basic compounds and amino acids, which were unable to be detected by the above voltammetry. Strongly acidic compounds such as carbon (C-H) acids were detected by means of voltammetric reduction of vitamin K3 using acetonitrile media, and it was applied to the pKa, AN determination of C-H acids with a wide range of acidity. Moreover, strongly basic compounds and amino acids were determined by means of voltammetric reduction of 3,5-di-tert-butyl-1,2-benzoquinone coupled with a concept of acid-base back titration. In conclusions, detectable acidic and basic compounds have increased through the development of the novel electroanalytical methods.

研究分野：分析化学

キーワード：電気化学 分析化学 酸性物質 塩基性物質 アミノ酸 酸解離定数

1. 研究開始当初の背景

科学や産業を支える基盤には、様々な酸・塩基性物質が寄与している。例えば、燃料電池開発では超強酸性物質、環境分野では強塩基性物質、食品分野では弱酸性物質やアミノ酸などが挙げられ、このような酸・塩基性物質の計測は様々な分野においてニーズがある。

電気化学分析は、装置の小型化・低価格が容易、測定に要する消費電力が少ないなどの特長がある。しかし、酸・塩基性物質の計測において、その多くの物質が電極不活性であるため、電気化学分析の適用が困難になることがあった。電気化学分析の制約を解決することができれば、汎用型で科学や産業に広く普及できる分析法が開発できると考えた。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに微量の酸性物質の存在下で 3,5-ジ-*tert*-ブチル-1,2-ベンゾキノ (DBBQ) のようなキノンの電解還元を行うと、ボルタモグラム上に酸の濃度に依存的な還元前置波が現れることを見出し、この電流計測を酸の定量法として確立した。さらに、微量の弱塩基性物質の存在下でトコフェロールの電解酸化を行うと、ボルタモグラム上に弱塩基の濃度に依存的な酸化前置波が現れることを見出し、この電流計測を塩基の定量法として確立した。このように、電極不活性な物質であっても酸・塩基性物質であれば、電気化学分析の対象として扱えることを示し、多くの実用分析法を考案してきた [1]。しかし、燃料電池開発、環境分野、食品分野において計測のニーズのある超強酸性物質、強塩基性物質、アミノ酸については未踏であり、本法のワイドレンジ化、すなわち分析対象の拡張を図る必要があった。

本研究では、超強酸性物質、強塩基性物質、アミノ酸を検出できる新規電気化学分析法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

電気化学測定システム (HZ-7000, 北斗電工) を用いてボルタンメトリーを行った。3 電極式の電解セルは、作用電極にプラスチックフォームドカーボン (PFC)、参照電極に Ag/AgCl 電極、対極に白金線、6 mL 容量のピーカー型セルを用いて構築した。

キノ試薬には DBBQ あるいはビタミン K3 (VK3) を使用し、これらのキノ試薬と支持電解質を水-有機溶媒混液に溶解させて電解質溶液を調製した。

4. 研究成果

(1) 超強酸性物質の酸解離定数 (pK_a) 測定法

トリフルオロメチルスルホニル基を有する炭素酸のような超強酸性物質は、液相で pK_a を測定する方法が無いと、気相酸性度 GA の値で評価せざるを得なかった [2]。そこで、超強酸性物質の検出にキノンの還元前置波に基づく酸測定法の適用を図るとともに、これを pK_a 測定法として確立した。

p-トルエンスルホン酸存在下において VK3 のボルタンメトリーを行ったところ、*p*-トルエンスルホン酸による VK3 の還元前置波が +0.307 V vs. Ag/AgCl に観察され、その半ピーク電位 ($E_{p/2}$) は +0.391 V vs. Ag/AgCl であった。同様に、4-クロロベンゼンスルホン酸、硫酸、メタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、サッカリン、2,4-ジニトロフェノールの存在下で VK3 のボルタンメトリーを行った。各々の超強酸性物質による還元前置波の $E_{p/2}$ を求め、これらをアセトニトリル中の pK_a ($pK_{a,AN}$) の文献値 [3] に対してプロットした。 $pK_{a,AN} = 7.16 \sim 16.66$ の範囲において式 1 の回帰式が得られ、本法が適用できる $pK_{a,AN}$ の範囲は、約 7~17 であることが分かった。

$$E_{p/2} = -0.05907 pK_{a,AN} + 0.86646 \quad (r = 0.986) \quad (\text{式 1})$$

本法によりスルホニル基を有する様々な超強酸性炭素酸の $pK_{a,AN}$ を求め (表 1)、超強酸性炭素酸の構造と酸の強さの関係性を考察することができた [4]。本法は、微量な試料量 (約 1 mg) と短い測定時間 (約 1 min/assay) で pK_a が評価できるハイスループットな分析法であることを示した。超強酸性物質は有機分子触媒や燃料電池材料へ利用されており、本法はこれらの研究分野における材料開発を支援する分析技術として有用であると考えられた。

表1 ボルタンメトリーで求めた炭素酸の $pK_{a,AN}$ [4]

炭素酸	$E_{p/2}$ (V vs. Ag/AgCl)	$pK_{a,AN}$
	R = CF ₃	+0.252
	R = <i>n</i> -C ₄ F ₉	+0.337
	R = F	-0.077
	R = Cl	+0.008

(2) 強塩基性物質の定量法

研究代表者が開発したトコフェロールの酸化前置波測定に基づく弱塩基性物質の検出法は、非水溶媒中での測定を要するなどの制約があった [5]。従って、非水溶媒に溶けにくい強塩基性物質の定量法への適用が困難であった。そこで、本研究では、キノンの還元前置波による酸測定法に中和逆滴定を組み合わせる方法を強塩基性物質の定量法として考案した。すなわち、過量の強酸と強塩基性物質の中和反応によって生じた余剰酸をキノンの還元前置波測定により定量し、これを強塩基性物質の量へ換算するものである。

塩酸存在下において DBBQ のボルタンメトリーを行ったところ、塩酸による DBBQ の還元前置波が -0.1 V に観察された (図 1 A)。水酸化ナトリウム (NaOH) を添加して同様のボルタンメトリーを行うと、余剰の塩酸による DBBQ の還元前置波の波高は、小さくなった (図 1 B)。還元前置波の波高は共存する NaOH の濃度依存的に減少し、0.10~5.0 mmol/L の濃度範囲において良好な直線性を示した ($r = 0.996$)。NaOH を水酸化カリウム (KOH)、水酸化バリウム (Ba(OH)₂) に代えてボルタンメトリーを行ったところ、還元前置波の波高は濃度依存的に減少した。一酸塩基である NaOH、KOH と、二酸塩基である Ba(OH)₂ の検量線の傾きを比較したところ、約 1:2 であり、本法は強塩基性物質の当量濃度を定量できることが分かった。

本法は水に溶解しやすい強塩基性物質の定量に適用できることを示した。これにより、水試料のアルカリ度測定へ応用できる環境分析法として構築可能と考えられた。

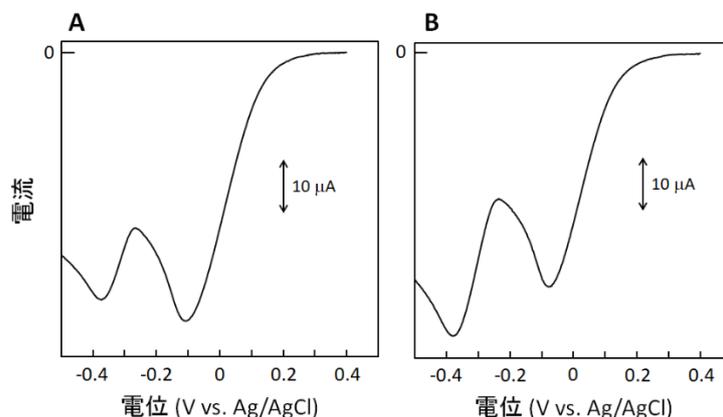


図1 塩酸共存系の DBBQ のボルタモグラム

測定条件： DBBQ を含む支持電解質溶液、10 mmol/L の DBBQ、5.0 mmol/L の塩酸、33 mmol/L の塩化ナトリウムを含むエタノール-水 (56:44, v/v) 混液；水酸化ナトリウムの濃度、(A) 0 mmol/L、(B) 1 mmol/L；走査速度、20 mV/s。

(3) アミノ酸の定量法

食品中のアミノ酸は、味わいにも影響を及ぼすことから、食品分野において重要な分析対象である。主要なアミノ酸の多くは電極不活性であり、これらを電解酸化或いは電解還元に基づいて検出するには、電極活性な試薬を利用した誘導体化法が利用される [6]。しかし、マトリックスが複雑な食品を試料とした場合、前処理やクリーンアップ操作が煩雑になることが多く、汎用的な分析法としての適用には至っていない。そこで、キノンの還元前置波による酸測定法に中和逆滴定を組み合わせる方法がアミノ酸の定量法として適用することが可能か検討した。

塩酸と DBBQ を含む支持電解質溶液を電解セルに注ぎ、20 mV/s の走査速度でボルタンメトリーを行ったところ、DBBQ の還元波が -0.40 V vs. Ag/AgCl、還元前置波が -0.13 V vs. Ag/AgCl に出現した。同様の測定を Lアラニンの存在下で行ったところ、還元前置波の波高が減少した。他に、15 種類の中性アミノ酸、2 種類の酸性アミノ酸、3 種類の塩基性アミノ酸、計 20 種類の

α アミノ酸についても余剰の塩酸による DBBQ の還元前置波の波高は減少し、本法はアミノ酸の網羅的な検出に適用できることがわかった [7]。また、Dアラニンでも還元前置波の波高が減少することを観測し、本法が D 体の検出にも適用できることを確認した。余剰の塩酸による還元前置波の波高は、アミノ酸の濃度依存的に減少し、アミノ酸の濃度と比例関係があることを示した。一酸塩基である Lアラニン、グルタミン酸、ロイシンと、二酸塩基であるアルギニン、ヒスチジン、リジンの検量線の傾きを比較したところ、約 1:2 であった (表 2)。本法では、検液中のアミノ酸を塩基として検出し、その当量濃度を定量できることがわかった。

発酵食品の製造過程における品質管理を目的としたアミノ酸測定では、アミノ酸の総濃度 (アミノ酸度) を定量する滴定法が利用されている。本法は、この測定に替わる簡便な電気化学分析法として適用できると考えられた。

表 2 本法におけるアミノ酸の検量線と直線範囲 [7]

アミノ酸	検量線の回帰式	相関係数 (r)	直線範囲 (mmol/L)
Lアラニン	$y = -6.27x + 50.83$	-0.996	0.05 - 2.0
グルタミン酸	$y = -6.12x + 48.98$	-0.997	0.05 - 2.0
ロイシン	$y = -6.13x + 49.22$	-0.999	0.05 - 2.0
アルギニン	$y = -13.25x + 47.30$	-0.999	0.05 - 1.5
ヒスチジン	$y = -13.46x + 50.16$	-0.997	0.05 - 1.5
リジン	$y = -13.00x + 51.45$	-0.997	0.05 - 1.5

以上のように、本研究では、超強酸性物質の検出にはアセトニトリル中での VK3 のボルタンメトリーを、強塩基性物質とアミノ酸の検出には DBBQ の電解還元に基づく酸測定法に中和逆滴定を組み合わせる方法を開発し、本法の分析対象を拡張することができた。

参考文献

- [1] A. Kotani, et al., J. Electrochem. Soc., 167, 37517 (2022).
- [2] J. Reijenga, A. et al., Anal. Chem. Insights, 8, 53 (2003).
- [3] F. Eckert, et al., J. Comput. Chem., 30, 799 (2009).
- [4] A. Kotani, et al., Electrochemistry, 89, 121 (2021).
- [5] A. Kotani, et al., J. Electroanal. Chem., 624, 323 (2009).
- [6] M.Y. Chang, et al., J. Chromatogr. Sci., 25, 460 (1987).
- [7] A. Kotani, et al., Electroanalysis, 30, 2988 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sun Yuwen, Kotani Akira, Machida Koichi, Yamamoto Kazuhiro, Hakamata Hideki	4. 巻 70
2. 論文標題 Determination of Phenolic Compounds in Beverages by Three-Flow Channel Isocratic HPLC with Electrochemical Detections Using a Column-Switching Technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 43 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 KOTANI Akira, MIYAGUCHI Yuji, MIYASHITA Naoto, KUSU Fumiyo, TAKAMURA Kiyoko, HAKAMATA Hideki	4. 巻 70
2. 論文標題 HPLC with Electrochemical Detection Systems for Quantitative Analysis of Functional Components in Foods	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 415 ~ 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.70.415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 KOTANI Akira, YANAI Hikaru, MATSUMOTO Takashi, HAKAMATA Hideki	4. 巻 89
2. 論文標題 p <i>K</i> _a Determination of Strongly Acidic C-H Acids Bearing a (Perfluoroalkyl)sulfonyl Group in Acetonitrile by Means of Voltammetric Reduction of Quinone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electrochemistry	6. 最初と最後の頁 121 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5796/electrochemistry.20-65154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 KOTANI Akira, KANEKO Maki, MACHIDA Koichi, YAMAMOTO Kazuhiro, HAKAMATA Hideki	4. 巻 36
2. 論文標題 Electrochemical Determination of Titratable Acidity for the Discrimination of Schisandrae Chinensis Fructus and Schisandrae Sphenantherae Fructus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1003 ~ 1008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20p049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kotani Akira, Kusu Fumiyo, Takamura Kiyoko, Hakamata Hideki	4. 巻 167
2. 論文標題 Review- A Portable Voltammetric Sensor for Determining Titratable Acidity in Foods and Beverages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of The Electrochemical Society	6. 最初と最後の頁 037517 ~ 037517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1149/2.0172003JES	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kotani Akira, Kitamura Kanae, Kusu Fumiyo, Yamamoto Kazuhiro, Hakamata Hideki	4. 巻 30
2. 論文標題 Voltammetric Determination of Amino Acids Based on the Measurement of Reduction Prepeak of Quinone Caused by Surplus Acid after Neutralization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Electroanalysis	6. 最初と最後の頁 2988-2993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elan.201800480	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 坂爪美優、小谷 明、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 余剰酸のボルタンメトリーによるアルカリ度センサ開発の基礎検討
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林綾花、小谷 明、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 ボルタモグラム測定による北五味子と南五味子の鑑別法の開発
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷 明、下邨魁斗、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 牛肉中の遊離アミノ酸定量のためのキノンのボルタンメトリーの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺純平、小谷 明、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 日本酒のアミノ酸定量のためのボルタンメトリーの開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下邨魁斗、小谷 明、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 遊離アミノ酸のボルタンメトリーによる牛肉の熟成の評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩澤彩、小谷 明、小島佑介、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 電気化学検出HPLCを用いるカシュー中のエモジンの定量法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大崎智哉、小谷 明、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 電気化学検出HPLCを用いたフィンガープリント分析による北五味子と南五味子の鑑別
3. 学会等名 第66回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島佑介、小谷 明、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 塩酸性下での電解還元に基づくエモジンのHPLC法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大崎智哉、小谷 明、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 五味子の鑑別のための電気化学検出HPLCを用いるフィンガープリント分析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Kotani, F. Kusu, H. Hakamata
2. 発表標題 Multi-channel liquid chromatography with electrochemical determination system for determining bioactive redox compounds in herbal medicines
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Electroanalytical Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅生光波、小谷 明、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 塩基性物質の解離定数測定のための微分パルスボルタンメトリー
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大崎智哉、小谷 明、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 五味子のHPLCフィンガープリント分析への電気化学検出の適用
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Kotani
2. 発表標題 Determination of bioactive compounds by highly sensitive electrochemical detection in liquid chromatography
3. 学会等名 The International Joint Meeting of the Polarographic Society of Japan (PSJ) and National Taiwan University (NTU) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷 明
2. 発表標題 日本酒のアミノ酸度を手軽に測れるセンサ開発
3. 学会等名 アグリビジネス創出フェア2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島佑介、小谷 明、町田晃一、山本法央、袴田秀樹
2. 発表標題 塩酸性下におけるエモジンの電気化学検出とHPLCへの活用
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関