

ジヒドロキシベンズアルデヒド修飾電極による ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの電気化学的酸化

桑原敬司*, 阿部嵩也, 近藤みずき, 下村雅人

長岡技術科学大学 生物系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)
*kuwataka@vos.nagaokaut.ac.jp

Electrochemical oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide with a dihydroxybenzaldehyde-modified electrode

Takashi KUWAHARA, Syuya ABE, Mizuki KONDO, and Masato SHIMOMURA

Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Nagaoka University of Technology
1603-1, Kamitomioka-machi, Nagaoka 940-2188, Japan

(Received November 16, 2010; Accepted December 6, 2010)

Abstract

The electrochemical oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) was investigated by use of a carbon fiber paper (CFP) electrode modified with 2,5-dihydroxybenzaldehyde (25Q). The modified CFP (25Q/CFP) was prepared by electrochemical polymerization of 25Q in an acetonitrile solution. 25Q/CFP gave a reversible redox wave with a mid-potential (formal potential) of +0.02 V vs. Ag/AgCl in a 0.10 M phosphate buffer (pH 7.0). Electrochemical oxidation of NADH was successfully accomplished with 25Q/CFP, and the oxidation current reached 0.25 mA/cm² at +0.2 V vs. Ag/AgCl. The onset of oxidation of NADH was found at +0.01 V vs. Ag/AgCl, which corresponds to the mid-potential of 25Q/CFP at pH 7.0. The onset potential was 0.34 V lower than that observed with untreated CFP. The CFP electrodes modified with 3,4-dihydroxybenzaldehyde (34Q) and 2,3-dihydroxybenzaldehyde (23Q) were compared to 25Q/CFP with respect to the oxidation of NADH. The largest NADH oxidation current at +0.2 V was obtained with 23Q/CFP, and the current was 3.5 times as large as that with 25Q/CFP. However, the onset potential observed with 25Q/CFP for the oxidation of NADH was lower than that observed with 34Q/CFP and 23Q/CFP by 0.08 V.

Key Words: Dihydroxybenzaldehyde, NADH, Quinone, Electrochemical polymerization

1. はじめに

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)は多くの酸化還元酵素の補酵素として働く物質である。近年、酵素センサーやバイオ燃料電池、酵素活性の電気化学的な測定などに応用する目的でNADHを電気化学的に酸化する手法が検討されている[1-4]。NADHの電気化学的酸化は難しくなく、金属やカーボンの電極を使用して容易に酸化電流を得ることが可能である。しかし、NADHの電気化学的酸化は過電圧が大きく、これがしばしばこの電気化学反応を応用する際の問題点となっている。例えば、過電圧が大きい場合、センサーや活性測定では夾雑物の影響を受けてしまい、正確な測定値を得る妨げとなってしまう。また、電池に応用した場合は、起電力の低下を招くことになる。

NADHの過電圧を低下させるために、酵素や酸化還元色素によって修飾した電極を利用する方法が報告されている。SatoらはNADHをNADH酸化酵素であるジアフォラーゼを用いて酸化し、その後、電子メディエータを介してジアフォラーゼから電極へ電子を伝達することによって、NADHの間接的な電気化学的酸化を可能としている[5]。また、メチレンブルーなどの色素を用いて表面を修飾した電極によりNADHの過電圧を低下させる手法が報告されている[6-8]。この場合、実質電極上で酸化されている物質はNADHから電子を受け取った酸化還元色素であり、実際に酸化電流が生じる電位は各色素の酸化還元電位に依存している。

酸化還元物質の一つであるキノン類にもNADHを酸化できるものが存在する[9,10]。キノン類は多くの誘導体が入手可能であり、合成することもそれほど難しくない。そのため、NADHの電気化学的酸化に有効な分子構造を探索する際に、キノン類は有用な物質であると考えられる。

また、キノン類を電解重合することにより、電極の修飾が可能であるという報告がある。電解重合法は酸化還元色素による電極修飾の際にも利用されており、選択的かつ簡単に電極面を修飾できるため極めて有用である。例えば、*p*-ヒドロキノンを電解重合すると、ポリキノンが得られ、

それが電極表面に堆積することによってキノンによって修飾された電気化学的に活性な電極を得ることができる[11]。その他にも、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド(34Q)による電解修飾によって作製した電極を用いて、NADHの電気化学的酸化に対する過電圧を低下させることができることが報告されている[12]。

キノン類で最も単純な構造をしているベンゾキノン(ヒドロキノン)は一般に、オルト体よりもパラ体の方が電気化学的に酸化されやすい。NADHの電気化学的酸化が電極表面を修飾した酸化還元種に依存する可能性を考慮すると、パラ体で電極修飾を行うことにより、より低い電位でNADHを酸化できることが予想される。酸化電位の低下は夾雑物の反応の抑制および起電力の増加を導くことから、デバイスへの応用を考えた場合、非常に優位に働く。

そこで、本研究では*p*-ヒドロキノンの誘導体である2,5-ジヒドロキシベンズアルデヒド(25Q)によって修飾した電極の作製およびNADHの電気化学的酸化に対する特性評価、さらに、*o*-ヒドロキノン類により修飾した電極との比較を行った。我々の知る限りこれまでに25Qを用いた電極の電気化学的修飾に関する報告はなく、電解修飾に用いたキノンの構造の違いがNADHの電気化学的酸化に及ぼす影響を報告した例もない。本報告ではキノン類を利用したNADHの電気化学的酸化に関して得られた新たな知見について述べる。

2. 実験

2.1. 試薬

2,3-ジヒドロキシベンズアルデヒド(23Q)および25Q, 34Q, 2,5-ジヒドロキシ安息香酸(25QA)はSigma-Aldrich Co.から、NADHはロシュ・ダイアグノスティクス(株)、アセトニトリルおよび過塩素酸テトラエチルアンモニウムはナカライテスク(株)から購入した。その他の試薬や溶媒は特級もしくは分析用のものをそのまま用いた。すべての水溶液は純水生成装置から得た水を用いて調製した。

2.2. 電気化学的な実験

電極修飾および電気化学的な電極性能の評価はポテンシオスタット/ガルバノスタット (Autolab III, International Chemistry Co. Ltd.)に接続した一般的な三電極セルを用いて行った。作用極はマスクングにより実行面積を 0.5×0.5 cm に限定したカーボンファイバーペーパー (CFP, TORAY Ind., TGPH-90), もしくはそれを修飾したものを使用した。対向極および参照極は白金板電極および Ag/AgCl 電極をそれぞれ用いた。電気化学的な操作はすべて使用前に窒素ガスを 20 分以上通じて溶存酸素を除いた溶液を用いて窒素雰囲気下, 室温で行った。

2.3. 電極修飾

キノンによる電極修飾は, キノン (10 mM) および過塩素酸テトラエチルアンモニウム (0.10 M) を含むアセトニトリル中, 作用極に +1.5 V vs. Ag/AgCl の電圧を 600 s 印加することによって行った。修飾電極は蒸留水でよく洗浄した後, 0.10 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で保存した。

3. 結果と考察

3.1. 25Q による電極の修飾

Fig. 1 は 0.10 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で測定した 25Q 修飾電極 (25Q/CFP) および未修飾の CFP のサイクリックボルタモグラムを示している。CFP を利用した際は特に目立ったピークは確認されなかった。それに対し, 25Q で修飾することにより, 0 V 付近に酸化還元ピークが現れた。このことから, 電極が 25Q により修飾されたと考えた。また, 掃印速度を変化させて測定したサイクリックボルタモグラムの結果から, 掃印速度が 100 mV/s より小さい範囲ではピーク電位は変化しないが, さらに掃印速度が大きくなるにつれて (2000 mV/s まで測定) 徐々にピーク間電位が広がることがわかった。これは修飾物内で電荷の拡散が生じていることを示している。

Fig. 2 は 25Q/CFP で観察される酸化還元波の E_m (酸化ピークと還元ピークの中点の電位) を pH に対してプロットしたものである。 E_m は一般的なキノン類と同様に pH に依存して変化した。このことから, 25Q/CFP に見られ

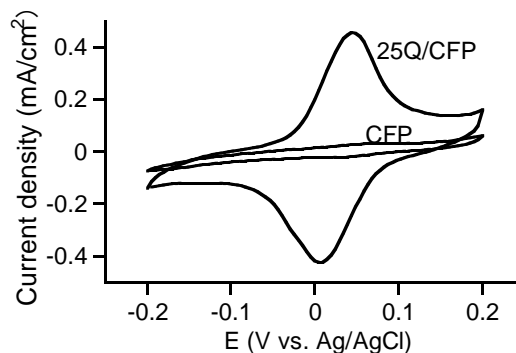


Fig. 1 Cyclic voltammograms of 25Q/CFP and CFP at 10 mV/s in 0.10 M phosphate buffer (pH 7.0).

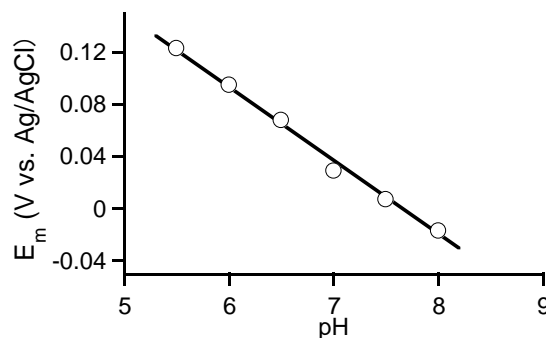


Fig. 2 Dependence of E_m of 25Q/CFP on pH.

る酸化還元反応にはプロトンが関与していることがわかった。また, pH と E_m の関係の傾きが -57 mV/pH であったことから, 反応プロトン数と電子数はほぼ同じであるといえる。すなわち, 25Q/CFP ではキノン単位が保持され, 酸化還元反応を行っていると考えられる。また, 酸化還元種がすべてキノン単位であると仮定して電荷量から求めた修飾キノン量は 2.6 nmol/cm² であった。

3.2. 25Q 修飾電極による NADH の電気化学的酸化

NADH 存在下, 25Q/CFP を用いて測定したサイクリックボルタモグラムを Fig. 3A に示した。比較として, 未修飾の CFP を使用した際の結果も共に示している。NADH が溶液中に存在することにより, いずれの電極を用いた場合も NADH の電気化学的酸化に由来すると考えられる酸化電流が確認された。また, 25Q/CFP を使用した場合でも NADH を含まない緩衝液中とは異なり, 還元ピークは見られなかった。すなわち, 電極表面での 25Q による積極的な NADH の酸化が起こっていると考えられる。

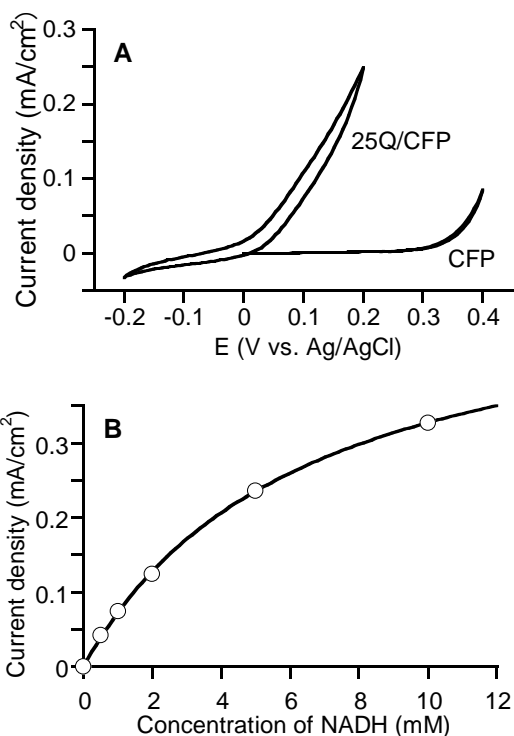


Fig. 3 (A) Cyclic voltammograms of 25Q/CFP and CFP at 10 mV/s in 0.10 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 5 mM NADH. (B) Dependence of the oxidation current obtained with 25Q/CFP on the concentration of NADH.

NADH 酸化電流は 25Q/CFP および CFP, いずれの電極においても観察されたが, その立ち上がり位置は大きく異なり, 25Q/CFP の方が 0.34 V 程低かった. これらの結果より, 25Q による電気化学的な電極の修飾は NADH の電気化学的な酸化に有効に作用するといえる.

Fig. 3B は NADH 酸化電流の NADH 濃度依存性を示している. NADH 濃度の増加にともない, NADH の電気化学的酸化電流は増加した. 電流値は 2 mM のあたりまでは NADH 濃度に対して一次関数的に増加し, その後徐々に増加量が減少する傾向を示した. この結果は 25Q/CFP を NADH の電気化学的な検出 (下限検出限界 0.08 mM, S/N=3) に使用可能であることを示している. また, 直線範囲 (0–2 mM) の傾きは 0.066 mA/mM · cm² であった.

3.3. 電極上に堆積した 25Q 由来物の構造の推定

p-ヒドロキノンを経電重合した場合, その生成物は C-O-C 結合を含まず, 2 位および 5 位, もしくは 3 位で環が連なった構造をとることが報告されている [11]. また,

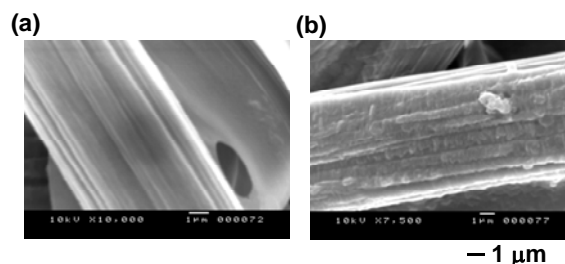


Fig. 4 SEM images of (a) CFP and (b) 25Q/CFP.

34Q に関しては直接的な構造決定は成されていないものの, 多量化していることが示されている [12]. しかし, これまでに電気化学的手法を用いて 25Q による電極修飾を行った例はなく, その構造も報告されていない. そこでまず, 本研究で得られた堆積物に対して IR による構造の推定を試みたが, 明確なスペクトルを得ることはできなかった. そのため, 本報告では電気化学的な評価により得られた情報などからの堆積物の構造の推定について示した.

Fig. 4 の SEM 写真から確認できるように 25Q によって CFP 表面が修飾されていることは確かである. また, Fig. 2 の結果から, 堆積物はキノン構造を保持していることが分かっている. 25Q/CFP で観察される E_m (+0.02 V) は遊離の 25Q で観察される E_m (+0.09 V) と異なるため, 堆積物は 25Q そのものではないと考えられる. しかし, 単純な吸着により電極表面が修飾されている可能性は否定できない. そこで, 25Q を溶解させた緩衝液中に 5 分間 CFP を浸漬させた後, 蒸留水で洗浄, そして 25Q を含まない緩衝液中でサイクリックボルタンメトリを行うことにより吸着の影響を調べた.

Fig. 5 は 25Q を吸着した CFP を用いて緩衝液中で得られたボルタモグラムの 1 サイクル目と 15 サイクル目を示している. 図中の番号はサイクル数を, 矢印は酸化ピークおよび還元ピークの増減を示している. 図に示されるように, サイクルを重ねることにより, +0.2 V 付近にあった酸化ピークは消失し, +0.05 V 付近に新たな酸化ピークが現れた. また, 0 V 付近の還元ピークも減少し, それにともなって, -0.02 V のあたりに新たな還元ピークが現れた (Fig. 5 挿入図). 1 サイクル目の波形は遊離の 25Q とよく

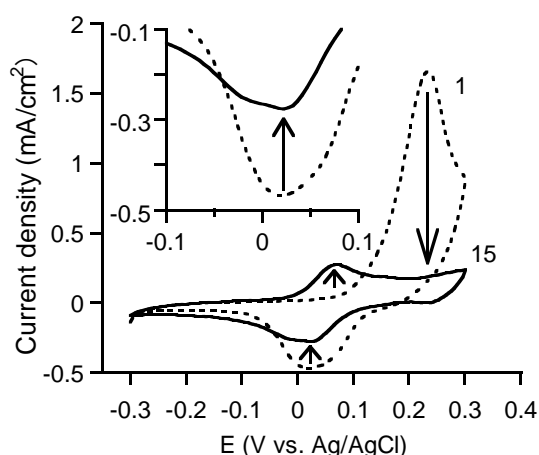


Fig. 5 Cyclic voltammogram of CFP adsorbed with 25Q at 100 mV/s in 0.10 M phosphate buffer (pH 7.0). The numbers correspond to cycle number. Inset: reduction peaks of voltammograms.

似ている。また、新たに現れた酸化ピークと還元ピーク間の E_m は +0.02 V であり、25Q 由来の堆積物と同じであった。これらの結果から、25Q は吸着状態では遊離状態と同様の構造を保っていること、電圧の印加によりおそらく近接した 25Q 同士で新たな結合を形成し、それによって新たなピークを生じるということがわかった。すなわち、25Q 由来の堆積物は 25Q 分子が単に電極上に吸着したものではなく、25Q 同士がなんらかの結合を介して多量体化したものであるといえる。

また、本報告の電極修飾時の電圧の範囲ではアルデヒド基は電気化学的に酸化されていないと考えられる[13]。しかしながら、可能性が全くないわけではない。そこで、アルデヒド基の電気化学的な酸化により生成する可能性が予想される 25QA を用いた電気化学的な評価についても行った。その結果、まず、遊離状態での E_m が異なること、電極修飾後についてもキノン構造に由来する酸化還元ピークの位置が 25Q/CFP とは異なること、ピーク電流値が 25Q/CFP と比較すると非常に小さいこと、さらに波形も異なることがわかった。この結果のみでは 25Q 由来の堆積物中にカルボキシル基が存在することは否定できないが、25Q の電解酸化により 25QA が生成された後、それらが重合を行い電極上に堆積している可能性は極めて低いと考えられる。

ここまでの結果から、25Q 由来の堆積物は主にポリフ

Table 1 Electrochemical properties of CFP modified with dihydroxybenzaldehyde

	E_m (V)	E_{on} (V)	$i_{0.2}$ (mA/cm ²)
CFP	-	0.35	0.00
25Q/CFP	0.02	0.01	0.25
34Q/CFP	0.15	0.10	0.64
23Q/CFP	0.18	0.11	0.88

E_m : The mid-potential of redox peaks

E_{on} : The onset potential of oxidation of NADH

$i_{0.2}$: Current density of NADH oxidation at 0.2 V vs. Ag/AgCl

ェニレン様の結合を持ち、モノマーのキノン構造に由来する酸化還元反応を示していると推測される。また、堆積物は水中での安定性が高いが、エタノールで洗浄することによって、一部が電極上から脱離することから、オリゴマー程度の重合体を多く含んでいる可能性が考えられる。

3.4. σ キノン類との比較

Table 1 に三種のキノンによって修飾した電極の電気化学的な評価にて得られた結果を示した。緩衝液中で測定したサイクリックボルタンメトリの結果から、*p*-ヒドロキノン由来の 25Q/CFP の E_m は 0 V 程度であるのに対し、 σ -ヒドロキノン由来の 34Q/CFP と 23Q/CFP により修飾した電極の E_m はそれぞれ +0.15 および +0.18 V であることがわかった。また、ピーク位置などに違いはみられるものの、三種いずれのキノン類を用いた場合にも修飾量に大きな差は見られなかった。なお、23Q による電極修飾に関しても 25Q と同様、これまで報告されてない。

NADH 酸化電流は 23Q/CFP が最も大きく、+0.2 V の時の電流値と比較して、その値は 25Q/CFP で得られた値の 3.5 倍程度であった。次いで大きな電流値を示したものは 34Q/CFP であり、25Q/CFP を用いて得られた電流値は修飾電極の中では最も小さな値であった。25Q による修飾は未修飾の CFP と比較すると NADH 酸化電流の大幅な増加を導くため、極めて有効である。しかし、得られる電流値に関しては、 σ キノン類の方が *p*-キノン類よりも、さらに有効であるという結果となった。これは遊離のキノンによる NADH の酸化反応の傾向と類似しており[9]、この結果からも、電極修飾後も修飾に使用したキノンと同様

の構造が堆積物中に保持されていることが推測される。

また、電流値に関しては σ キノンが大きかったが、酸化電流の立ち上がり電位(E_{on})については、修飾電極の E_m と同様に 25Q/CFP を用いた場合が最も低かった。つまり、当初の予測通り、 p キノンを利用することにより NADH の電気化学的な酸化に要する過電圧を効果的に低下させることが可能であるといえる。電流値については修飾量や修飾法の最適化を今後行っていくことで、増加させることが可能である。しかしながら、電位に関しては使用する物質に依存するため、例えば 34Q の電位を 25Q と同程度に下げることが非常に困難である。したがって、本研究で検討したような、遊離状態での電位を参考にしたキノン修飾電極の作製が、キノン修飾電極を NADH 電気化学的な酸化に応用していく際には有効であるといえる。また、電解重合した後も σ キノンの方が NADH に対して高い反応性を有することが新たに明らかとなった。今後、これらの結果を踏まえてナフトキノン類などについても検討範囲を広げることによって、さらに効率的な NADH 酸化が可能な電極修飾法を見出すことができると考えられる。

4. まとめ

電気化学的な手法を用いて 25Q による CFP の修飾を試みた。25Q に由来する堆積物はキノン単位を含んでいることが確認できたが、厳密な構造の決定には至らなかった。25Q/CFP は未修飾の CFP を利用した場合と比較して NADH 酸化の過電圧を 0.34 V 程度低下させた。また、NADH 酸化電流の大きさは NADH 濃度に依存し、ここで作製した電極は NADH の検出(下限検出限界 0.08 mM)に応用可能であることがわかった。23Q や 34Q で修飾した電極との比較から、NADH 酸化電流の大きさについては劣るものの、当初予測した通り、NADH 酸化の立ち上がりの電位は 25Q を利用した方が低いことがわかった。今後、ナフトキノン類など他のキノン類による電極修飾を検討することによって、さらに NADH の電気化学的酸化に有効な電極を創出しようものと考えられる。

引用文献

- [1] K. Tanaka, S. Ikeda, N. Oyama, K. Tokuda, T. Ohsaka, Preparation of Poly(thionine)-modified electrode and its application to an electrochemical detector for the flow-injection analysis of NADH, *Anal. Sci.*, 9, 783-789 (1993).
- [2] P. Du, S. Liu, P. Wu, C. Cai, Single-walled carbon nanotubes functionalized with poly(nile blue A) and their application to dehydrogenase-based biosensor, *Electrochim. Acta*, 53, 1811-1823 (2007).
- [3] R. Antiochia, I. Lavagnini, P. Pastore, F. Magno, A comparison between the use of a redox mediator in solution and of surface modified electrodes in the electrocatalytic oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide, *Bioelectrochemistry*, 64, 157-163 (2004).
- [4] N. L. Akers, C. M. Moore, S. D. Minter, Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes, *Electrochim. Acta*, 50, 2521-2525 (2005).
- [5] F. Sato, M. Togo, M. K. Islam, T. Matsue, J. Kosuge, N. Fukasaku, S. Kurosawa, M. Nishizawa, Enzyme-based glucose fuel cell using vitamin K₃-immobilized polymer as an electron mediator, *Electrochem. Commun.*, 7, 643-647 (2005).
- [6] F. Gao, Y. Yan, L. Su, L. W. L. Mao, An enzyme glucose/O₂ biofuel cell: Preparation, characterization and performance in serum, *Electrochem. Commun.*, 9, 989-996 (2007).
- [7] C. I. Ladiu, I. C. Popescu, L. Gorton, Electrocatalytic oxidation of NADH at carbon paste electrodes modified with meldola blue adsorbed on zirconium phosphate: effect of Ca²⁺ and polyethyleneimine, *J. Solid State Electrochem.*, 9, 296-303 (2005).
- [8] F. Tian, G. Zhu, Toluidine blue modified self-assembled silica gel coated gold electrode as biosensor for NADH, *Sens. Actuators, B*, 97, 103-108 (2004).
- [9] N. Scherbak, Å. Strid, L. A. Eriksson, Non-enzymatic oxidation of NADH by quinines, *Chem. Phys. Lett.*, 414, 243-247 (2005).
- [10] B. W. Carlson, L. M. Larry, mechanism of the oxidation of NADH by quinones. Energetics of one-electron and hydride routes, *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 479-485 (1985).
- [11] K. Yamamoto, T. Asada, H. Nishide, E. Tsuchida, The preparation of poly(dihydroxyphenylene) through the electro oxidative polymerization of hydroquinone, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 63, 1211-1216 (1990).
- [12] F. Parlrinta, E. Lorenzo, H. D. Abruña, Electrocatalysis of NADH oxidation with electropolymerized films of 3,4-dihydroxybenzaldehyde, *Anal. Chem.*, 66, 4337-4344 (1994).
- [13] D. Nematollahi, A. Amani, Mechanistic study of electrochemical oxidation of 2,5-dihydroxybenzoic acid and 3,4-dihydroxybenzaldehyde in the presence of 3-hydroxy-1*H*-phenalene-1-one, *Chem. Pharm. Bull.*, 56, 513-517 (2008).