The Japan Society for Analytical Chemistry

BUNSEKI KAGAKU Vol. 51, No. 6, pp. 403–407 (2002)

© 2002 The Japan Society for Analytical Chemistry

報　文

シクロデキストリン単分子膜修飾電極におけるカテコールアミン類の応答

鈴木　巌®*，江川　祐哉*，安斉　順一*

Electrochemical responses of catecholamines at a cyclodextrin monolayer-modified electrode

Iwao SUZUKI, Yuya EGAWA and Jun-ichi ANZAI*

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578

(Received 18 January 2002, Accepted 6 March 2002)

Electrode reactions of catecholamines were investigated by employing a gold electrode covered with a monolayer of a cyclodextrin derivative (**1**), which was prepared from bis (ω-carboxyundecyl) disulfide and 6-amino-6-*O*-deoxy-β-cyclodextrin. The electrode reaction of L-DOPA was mostly prevented by a **1**-monolayer at the surface of a gold electrode. On the other hand, the electrode reactions of dopamine, norepinephrine, epinephrin still maintained about 50～30% of their original values when compared with corresponding anodic peak currents. Combining the results on the electrode reactions of ferrocene derivatives at the **1**-monolayer modified electrode, we considered that the **1**-monolayer would recognize the presence or absence of the carboxyl group in catecholamines.

Keywords : cyclodextrin ; self-assembled membrane ; catecholamines ; cyclic voltammetry.

1　緒　　言

シクロデキストリンはグルコースの環状同族体であり，水溶液中にて種々の有機化合物を，主として疎水性相互作用やファンデルワールス相互作用によって包接することが可能なホスト分子である[1)~3)]．シクロデキストリンの持つ包接能力を界面上で発揮させる試みも古くから行われており，適切な修飾シクロデキストリンによるラングミュアー-ブロジェット膜や自己集合膜が種々作製され，その分子認識力について検討されている[4)~18)]．この中でも特に金と硫黄との間に形成される，金-メルカプチド結合を利用する自己集合膜法は，簡便な操作で単分子膜を作製できることから，近年シクロデキストリン修飾界面の作製に盛んに利用されている手法である[7)~18)]．著者らもこの手法を利用し，分子内にジスルフィド結合を有するリポ酸を修飾した，シクロデキストリンの金表面における単分子膜形成挙動や，シクロデキストリンに強く包接され，かつ電気化学的に活性なフェロセン誘導体を電気化学的マーカーとして用いる電極応答の解析などから，その分子認識能力についての検討を行っている[13)~18)]．

これまでに単分子膜を形成させる材料として用いられているチオール，ジスルフィド，あるいはスルフィド修飾シクロデキストリンは多数あるが，電気化学活性物質の電極応答について検討されているものの多くは，チオール基などのアンカー部位と，分子認識部位となるシクロデキストリン空孔をつなぐリンカー部の短いものが多く，その距離が大きく離れているものは多くない．一般に電気化学活性物質の電極応答は，電極表面の状態や電極からの距離に依存する．シクロデキストリン薄膜を修飾した電極では，シクロデキストリン空孔は分子認識場としての機能を有するが，シクロデキストリンそのものは電極応答を阻害する機能も併せ持つ．したがって，物質の違いによる電極応答の違いは，リンカー部の長いシクロデキストリン誘導体を用いることで，より明確に現れることが期待される．

* 東北大学大学院薬学研究科：980-8578　宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

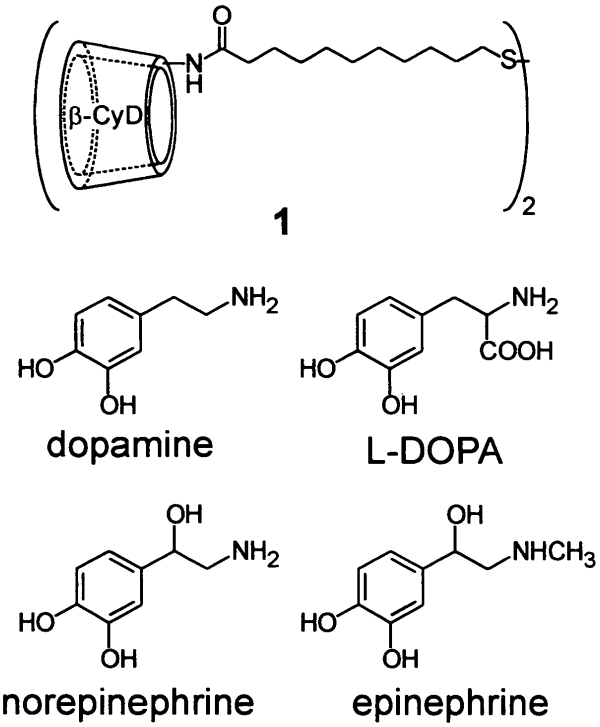

Fig. 1 Structures of 1 and catecholamines used in this study

そこで，本研究では金表面に吸着するアンカー部とシクロデキストリン空孔との間に，長鎖アルキル基を有する化合物 1 を合成し，1 の薄膜を修飾した金電極におけるカテコールアミン類（ドーパミン，L-DOPA，ノルエピネフリン，及びエピネフリン）の，電極応答について検討した (Fig. 1)．これらのカテコールアミン類は，生体内での神経伝達にとって重要な物質である．Kaifer らは，ビオローゲン単位を有するシクロファンを用い，カテコールアミン類を電気化学的に検出することを試みている[19]．この系では，シクロファンがカテコールアミン類を包接した際の，ビオローゲンの電気化学特性の変化を出力信号としている．しかしカテコールアミン類は，電気化学的に活性であり，直接検出することも可能である．カテコールアミン類はシクロデキストリン空孔が認識しうるベンゼン環を有していることから，カテコールアミン類の光学異性を含めた側鎖の違いを識別する機能性薄膜としても，シクロデキストリン単分子膜は有望である[12]．

2 実　　験

化合物 1 は，12-チオドデカン酸（12-ブロモドデカン酸より調製）のヨウ素酸化により得たビス(11-カルボキシウンデシル)ジスルフィドと，モノ-6-アミノ-6-*O*-デオキシ-*β*-シクロデキストリン[20]を，5-ヒドロキシトリアゾール共存下，*N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミドを作用させて縮合させた後，水から再結晶することで得た．測定に用いたカテコールアミン類及びフェロセン誘導体は，市販品をそのまま用いた．

化合物 1 の機器分析データ

IR（KBr）3370，1540 cm^{-1}．^{1}H-NMR（300 MHz，DMSO-d_6）δ 1.12～1.69（m，32H），2.02～2.15（m，4H），2.64～2.76（m，4H），3.15～3.78（m，HOD ピークに重畳），4.37～4.55（m，12H），4.83（s，14H），5.58～5.90（m，28H），7.55～7.67（m，2H）．元素分析値：計算値（$C_{106}H_{180}N_2O_{70}S_2\cdot 10H_2O$）C，44.72；H，7.08；N，1.09；S，2.37%．実測値 C，44.72；H，7.21；N，0.98；S，2.37%．

化合物 1 の単分子膜修飾電極は，表面をアルミナ研磨した後，0.5 M の硫酸中にて 20 分間三角波掃引（−0.2～1.5 V）を行った金ディスク電極（直径 3 mm）を，1 の 1 mM の *N,N*-ジメチルホルムアミド-エタノール混合溶液（1：1，容量比）に 1 日浸漬させた後，エタノールと純水にて洗浄し，風乾して作製した．

サイクリックボルタモグラム（CV）の測定には，日厚計測製ポテンショスタット/ガルバノスタット（関数発生器内蔵，NPGFZ-2501 型）を用い，上述した方法で作製した修飾金電極，あるいは三角波掃引を行い清浄化した金電極を作用電極とし，白金線及び銀塩化銀電極をそれぞれ対極及び参照極とする三電極配置により行った．用いた電解質は，あらかじめ脱気した 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）であり，測定前に更に乾燥窒素を通導させた．報文中に記載の電位はすべて銀塩化銀電極に対しての値である．

均一水溶液中での *β*-シクロデキストリンとカテコールアミン類との，1：1 のホスト-ゲスト化合物に対する結合定数は，カテコールアミン類の蛍光強度の *β*-シクロデキストリン濃度依存性（日本分光 FP-770 型蛍光分光光度計を使用）より，非線形最小二乗法により求めた．L-DOPA の蛍光強度の *β*-シクロデキストリン濃度に対する依存性は認められたものの，非常に小さかったため，L-DOPA の円二色性強度の *β*-シクロデキストリン濃度依存性より求めた（日本分光 J-720 型円二色性分散計を使用）．

3 結果と考察

Fig. 2 に，未修飾金電極及び 1 単分子膜修飾金電極を作用極としたときの，種々のカテコールアミン類のボルタモグラムを示す．カテコールアミン類の濃度は 0.5 mM，掃引速度は 0.1 V/s である．未修飾金電極の場合，いずれのカテコールアミン類も，0.2～0.25 V 付近にカテコール残基の電解酸化過程に対応する酸化波が観測される．対応する再還元波はドーパミンの場合に顕著であり，そのピークは対応する酸化ピークよりも約 30 mV 程度負側に観察されており，このボルタモグラムは，ドーパミンの電極酸化

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

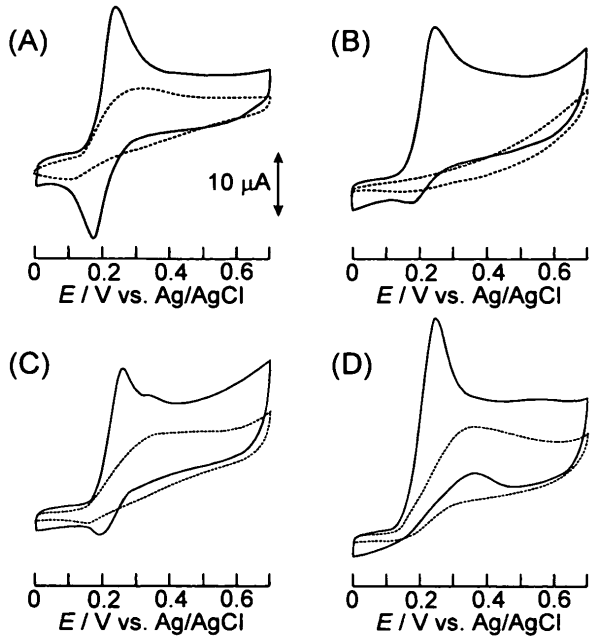

Fig. 2 Cyclic voltammograms of catecholamines {(A), dopamine; (B), L-DOPA; (C), norepinephrine; (D) epinephrine} at a bare (solid lines) and 1-monolayer modified (dotted lines) gold electrodes in 0.1 M phosphate buffer solutions (pH 7.4)

Concentration of the catecholamines: 0.5 mM; Scan rate: 0.1 V/s; Electrode area: 7.1 mm^2

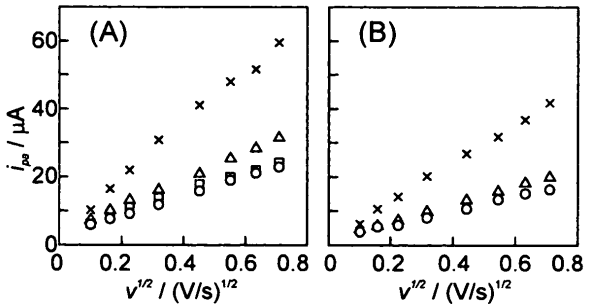

Fig. 3 Correlations between square root of scan rate and anodic peak current of catecholamines (○, dopamine; □, L-DOPA; △, norepinephrine; ×, epinephrine) at bare (A) and 1-monolayer modified (B) gold electrodes

反応が二電子移動反応とそれに引き続く環化反応，更に環化体の酸化反応とからなるいわゆる ECE 過程であるものの[21]，拡散律速過程であることを示唆している．ボルタモグラム上の L-DOPA とノルエピネフリンの再還元波は非常に小さい．しかし，これらのカテコールアミン類の再還元波は対応する酸化ピークよりも，約 30 mV 程度負側に観察されており，これらの電極反応もやはり拡散律速であることが示唆される．エピネフリンでは再還元波は観察されない．しかし，一連のカテコールアミン類の電極応答と構造とから類推すると，エピネフリンでも拡散律速の電極応答が起こっているものと考えられる．これらのカテコールアミン類の電極酸化反応が拡散律速過程であることは，Fig. 3(A) に示した掃引速度の平方根に対する酸化ピーク電流値の関係が，直線関係になっていることからも支持される[22]．ドーパミン，L-DOPA，ノルエピネフリン，そしてエピネフリンのボルタモグラム上で認められた再還元波の電流値の違いは，電子移動に引き続く環化の速度の違いによるものとされている[21)23)]．また，ノルエピネフリンでは，酸化ピークの約 0.1 V ほど正側に小さい酸化ピークが認められる[24]．

一方，1 の単分子膜を修飾した電極におけるカテコールアミン類の電極応答は，未修飾金電極の場合に比べ抑制される．しかし，長鎖アルキル基を有するアルカンチオール修飾電極などの，密にパッキングしている自己集合膜で修飾した電極でのボルタモグラムとは異なり，電極応答が完全に阻害されるのではなく，ある程度の電極応答は観察される．例えば，ドーパミンの場合，未修飾金電極で認められた 0.21 V 付近の酸化ピークの位置が，0.26 V 付近へと 50 mV ほど正側にシフトしたほか，その酸化ピーク電流値も未修飾金電極の場合と比べると，約 40% 程度にまで減少している．また，再還元波についても同様のピーク位置のシフトとピーク電流値の減少が観察された．これらのことは，1 単分子膜修飾金電極では，単純なアルカンチオール修飾金電極とは異なり，1 の単分子膜中には 1 の空孔に基づく多数の「欠陥」が存在するために，電極応答が完全には阻害されなかったものといえる．したがって，1 単分子膜修飾電極における 1 の空孔は，これらのカテコールアミン類の電極応答を行う「反応場」としての機能を有している可能性がある．既に，α-シクロデキストリンに四つ程度のチオール基を導入させた化合物を単分子膜として修飾した金電極において，この α-シクロデキストリンの空孔が，カテコールアミン類の電極酸化反応の「反応場」として機能していることが示唆されており[10)~12)]，1 の場合も同様のことが起こっている可能性がある．しかし，Fig. 3(B) に示したようにピーク酸化電流値は，掃引速度の平方根に比例しており，金表面に存在する β-シクロデキストリン空孔に包接されたカテコールアミン類のみが電極応答を行っているのではなく，溶液中にあるフリーの状態のカテコールアミン類の拡散による電解酸化が，電流応答の主たるものであることが示唆される．

本研究で用いたカテコールアミン類の中で，ドーパミン，ノルエピネフリン，そしてエピネフリンは測定条件下 (pH 7.4) で正電荷を有していると考えられるが，L-DOPA はアミノ酸であり，測定条件下では両性イオンとして存在していると考えられる．この L-DOPA の電極応答は，Fig. 2 より明らかなように，1 の単分子膜によりよりほぼ完全

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

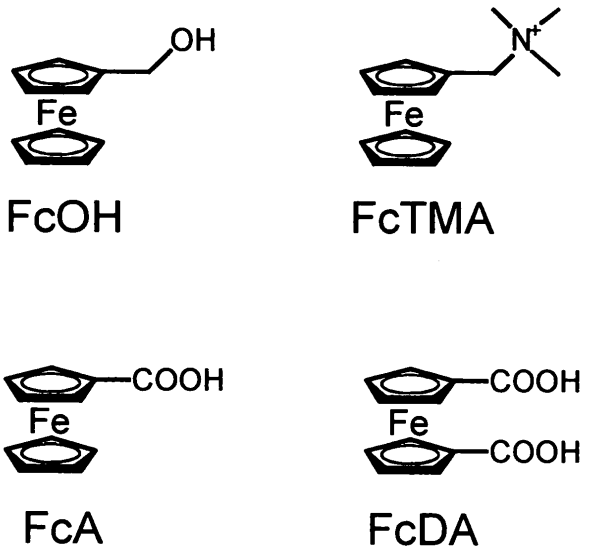

Fig. 4 Structures of ferrocenemethanol (FcOH), (ferrocenylmethyl) trimethylammonium (FcTMA), ferrocenecarboxylic acid (FcA), and 1,1'-ferrocenedicarboxylic acid (FcDA)

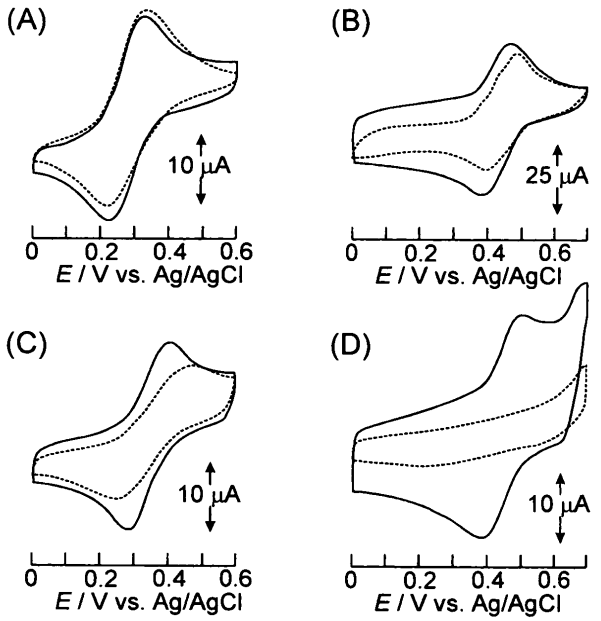

Fig. 5 Cyclic voltammograms of the ferrocene derivatives {(A), FcOH; (B), FcTMA; (C), FcA; (D), FcDA} at a bare (solid lines) and 1-monolayer modified (dotted lines) gold electrodes in 0.1 M phosphate buffer solutions (pH 7.4)

Concentration of the ferrocene derivatives: 0.5 mM; Scan rate: 0.1 V/s; Electrode area: 7.1 mm^2

に阻害される．すなわち，ボルタモグラム上で，L-DOPAの酸化ピークは0.7 Vまでの範囲で明確には認められず，また再還元ピークも0 Vまでの範囲で認められない．更に，0.2 Vにおける電流値は，ほかのカテコールアミン類では未修飾金電極のときの20% 程度の値を示すのに対し，L-DOPAではほぼ0であった．したがって，1単分子膜は，L-DOPAに対して極めて大きな阻害能力を持っているといえる．図には示していないが，1単分子膜の示すL-DOPAの電極応答に対する阻害能力は，カテコールアミン類の濃度を0.1 mMとした場合でも保持されており，カテコールアミン類の濃度には依存しない．

L-DOPAとその他のカテコールアミン類で観察されたCV上での違いは，β-シクロデキストリンとこれらのカテコールアミン類との間の親和性の違いに起因することも考えられる．そこで，均一水溶液中でのβ-シクロデキストリンとカテコールアミン類との結合定数を求めた．シクロデキストリンのゲスト分子に対する結合力については，単分子膜状態と均一溶液中とは異なる可能性があるが，これまでの報告においては，均一溶液中でシクロデキストリンに強く認識されるゲスト分子ほど，単分子膜状態においても界面に存在するシクロデキストリン空孔に強く包接されることが示唆されている[9)12)13)]．ドーパミン，ノルエピネフリン，そしてエピネフリンの結合定数は蛍光法により求められたが，L-DOPAの場合は，蛍光強度の変化が小さく蛍光法では求められなかったため，円二色性強度のβ-シクロデキストリンの濃度に対する依存性から求めた．その結果，β-シクロデキストリンとの結合定数はドーパミンで45 M^{-1}，ノルエピネフリンで50 M^{-1}，エピネフリンで172 M^{-1}，L-DOPAで20 M^{-1}であった．L-DOPAに対する結合定数は小さく，1単分子膜修飾電極上で観察された電極応答の著しい阻害に矛盾しない．ここで，均一溶液中での親和性の違いが，1単分子膜修飾電極における電極応答に大きな影響を及ぼすとすると，エピネフリンとその他のカテコールアミン類の間にも，電極応答の違いが認められることが考えられる．しかし，1単分子膜修飾電極上での電極応答は，L-DOPAとその他のカテコールアミン類との間には著しい違いがあったものの，エピネフリンとドーパミン，あるいはノルエピネフリンとの間の電極応答には違いは認められない．したがって，均一溶液中での結合力の違いが直接，1単分子膜修飾電極上でのカテコールアミン類の電極応答の差に結びついているとは考えにくい．

そこで，著者らは，今回用いたカテコールアミン類の中でL-DOPAのみがカルボキシル基を有していることに着目し，電極上で電子移動のみを行うフェロセン誘導体を用いた検討を行った．用いたフェロセン誘導体をFig. 4に示す．Fig. 5に示したように，未修飾金電極ではこれらのフェロセン誘導体のCVは，いずれも酸化ピークと再還元ピークの差が60 mV程度であり，可逆的な電子移動が起こっていることが分かる．一方，1単分子膜修飾電極では，アンモニウム基を有する（フェロセニルメチル）トリメチルアンモニウムと，電荷を持たないフェロセンメタノールは可逆的な電子移動が保持されていたが，測定条件下でカ

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

ルボキシル基を持つフェロセンカルボン酸及び1,1'-フェロセンジカルボン酸では，その電極反応は著しく阻害されていた．これらの結果は，金表面に化学吸着した1の層が，フェロセン誘導体のカルボキシル基の有無を認識している可能性の高いことを示すものである．

このフェロセン誘導体の結果より，カテコールアミン類についても，金表面に吸着した1の層が，カテコール残基の側鎖にカルボキシル基があるか否かを認識していることが想定される．したがって，1単分子膜修飾電極で観察されたL-DOPAの電極反応に対する高い阻害効果は，L-DOPAのβ-シクロデキストリン空孔に対する低い親和性だけでなく，1単分子膜がカルボキシル基を有する物質に対する識別能を発揮した結果との相乗効果としてとらえることができよう．

4 結　　言

シクロデキストリンなどの分子認識能を有する化合物を，電極などの固体基板上に固定化し，固液界面においてそれらの持つ分子認識能を発揮させることは，化学センサーなどの界面分子認識・識別系を開発する観点からも重要なことである．本研究で得られた結果は，1単分子膜がカルボキシル基を有する物質の電極応答を阻害する可能性を示すものである．しかし，現時点では，なぜ1単分子膜がカルボキシル基を有する物質のみに特異的は阻害効果を発揮するか，という機構については解明できていない．今後，この点を明らかにすることが重要であり，現在検討を進めている．

なお，本研究は日本学術振興会の科学研究費補助金（課題番号13680666）の支援にて行った．ここに感謝の意を表する．

文　　献

1) M. L. Bender, M. Komiyama: "*Cyclodextrin Chemistry*", (1978), (Springer-Verlag, Berlin).
2) J. Szejtli: "*Cyclodextrin Technology*", (1988), (Kluwar Academic Publishers, Dordrecht).
3) J. Szejtli, T. Osa (Eds): "*Cyclodextrins* (Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol.3)", (1996), (Pergamon, Oxford).
4) Y. Kawabata, M. Matsumoto, M. Tanaka, H. Takahashi, Y. Irinatsu, S. Tamura, W. Tagaki, H. Nakahara, K. Fukuda: *Chem. Lett.*, **1986**, 1933.
5) S. Nagase, M. Kataoka, R. Naganawa, R. Komatsu, K. Odashima, Y. Umezawa: *Anal. Chem.*, **62**, 1252 (1990).
6) K. Odashima, M. Kotato, M. Sugawara, Y. Umezawa: *Anal. Chem.*, **65**, 927 (1993).
7) M. T. Rojas, R. Königer, J. F. Stoddart, A. E. Kaifer: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 336 (1995).
8) G. Nelles, M. Weisser, R. Back, P. Wohfart, G. Wenz, S. Mitter-Nehr: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5039 (1996).
9) C. Henke, C. Steinem, A. Janshoff, G. Steffan, H. Luftmann, M. Sieber, H.-J. Galla: *Anal. Chem.*, **68**, 3158 (1996).
10) Y. Maeda, H. Kitano: *J. Phys. Chem.*, **99**, 487 (1995).
11) Y. Maeda, T. Fukuda, H. Yamamoto, H. Kitano: *Langmuir*, **13**, 4187 (1997).
12) T. Fukuda, Y. Maeda, H. Kitano: *Langmuir*, **15**, 1887 (1999).
13) P. He, J. Ye, Y. Fang, I. Suzuki, T. Osa: *Anal. Chim. Acta*, **337**, 217 (1997).
14) P. He, J. Ye, Y. Fang, I. Suzuki, T. Osa: *Electroanalysis*, **9**, 68 (1997).
15) I. Suzuki, K. Murakami, J. Anzai, T. Osa, P. He, Y. Fang: *Mater. Sci. Eng. C*, **6**, 19 (1998).
16) S. Yasuda, H. Shigekawa, I. Suzuki, T. Nakamura, M. Matsumoto, M. Komiyama: *Appl. Phys. Lett.*, **76**, 643 (2000).
17) I. Suzuki, K. Murakami: *J. Anzai, Mater. Sci. Eng. C*, **17**, 143 (2001).
18) I. Suzuki, K. Murakami: *J. Anzai, Mater. Sci. Eng. C*, **17**, 149 (2001).
19) A. R. Bernardo, J. F. Stoddart, A. E. Kaifer: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10624 (1992).
20) L. D. Melton, K. N. Slessor: *Carbohydr. Res.*, **18**, 29 (1971).
21) M. D. Hawley, S. V. Tatawawadi, S. Piekarski, R. N. Adams: *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 447 (1967).
22) A. J. Bard, L. R. Faulkner: "*Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*", p. 218, (1980), (John Wiley & Sons, New York).
23) M. E. Rice, B. Moghaddam, C. Creveling, K. L. Kirk: *Anal. Chem.*, **59**, 1534 (1987).
24) E. Bishop, W. Hussein: *Analyst* (London), **109**, 627 (1984).

要　　旨

ビス(ω-カルボキシウンデシル)ジスルフィドと6-アミノ-6-*O*-デオキシ-β-シクロデキストリンとを縮合した化合物（1）を自己集合的に吸着させた金電極を用いて種々のカテコールアミン類の電極応答を調べた．その結果，1の単分子膜は，L-DOPAの電極応答をほぼ完全に阻害するが，ドーパミン，ノルエピネフリン，エピネフリンの電極応答については完全には阻害せず，ピーク電流値の比較において未修飾金電極の場合の約50～30% の電極応答が観察された．フェロセン誘導体の電極応答からの類推より，1の単分子膜はL-DOPAのみに存在するカルボキシル基の有無を認識していることが示唆された．

NII-Electronic Library Service