

# Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> のペルオキシダーゼ様活性を利用 する比色・蛍光分析によるグルコース定量法

令和4年度

三重大学大学院 工学研究科

博士前期課程 分子素材工学専攻

生物機能工学講座 421M328

研究領域 F：先進物質・先進材料

分析環境化学研究室

柴田舞子

# 目次

1 章 序論	
1-1 糖尿病	1
1-2 グルコース	1
1-3 GOD-POD 法	2
1-4 PPD(p-フェニレンジアミン)	2
1-5 フェライト	3
1-6 OSiNDs	3
1-7 本研究の目的	4
2 章 実験	
2-1 試薬	5
2-2 使用器具	6
2-3 分析機器	6
2-4 実験操作	
2-4-1 Ni-CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> の調製	7
2-4-2 OSiNDs の調製	8
2-4-2 比色分析での定量実験	9
2-4-3 蛍光分析での定量実験	10
3 章 結果と考察	
3-1 ペルオキシダーゼ様活性	11
3-2 諸条件の PPD 酸化に与える影響	12
3-3 定常反応速度論分析	16
3-4 蛍光体 OSiNDs の蛍光特性	18
3-5 検量線	
3-5-1 過酸化水素	21
3-5-2 グルコース	22
3-6 干渉物質の影響	23
3-7 実試料の測定	24
3-8 特性評価	
3-8-1 XRD	25
3-8-2 SEM・TEM	26
3-8-3 BET	27
3-8-4 VSM	29

3-8-5 XPS .....	30
3-9 ESR .....	32
3-10 メカニズム .....	33
4 章 結論	
結論 .....	34
参考文献 .....	35
本研究に関する論文 .....	37
謝辞 .....	38

## 1 章 序論

### 1-1 糖尿病

糖尿病は代謝異常に起因する疾患で、血糖値が高いことが主な特徴である。血清中のグルコース濃度は、糖尿病や病気の監視や予防のための臨床指標として、広く認識されている。血糖値を調整すると、糖尿病の発症を効果的に制御し、腎不全、高血圧、心臓発作、失明等の合併症を最小限に抑えることができる。そのため、血糖値のモニタリングが非常に重要となる。これまでに、電気化学法、表面増強ラマン分光法、化学発光法などさまざまな血糖値検出技術が開発、適用されてきたが、その中で比色分析と蛍光分析は簡単な操作、迅速な分析、高い感度と選択性、低コストといった多くの利点を持っている。

### 1-2 グルコース

糖尿病の指標となる血糖値は血清中のグルコース濃度の事を指す。グルコースは分子式  $C_6H_{12}O_6$  を持つ糖で、すべての生体の主要なエネルギー源となる。それだけでなく、他の分子の形成の際の代謝中間生成物として生体システムで重要な役割を果たしている。

生体内で 1 モルのグルコースは、酵素であるグルコースオキシダーゼ (GOD) の触媒作用によってグルコン酸に酸化され、その際に過酸化水素を生成する。

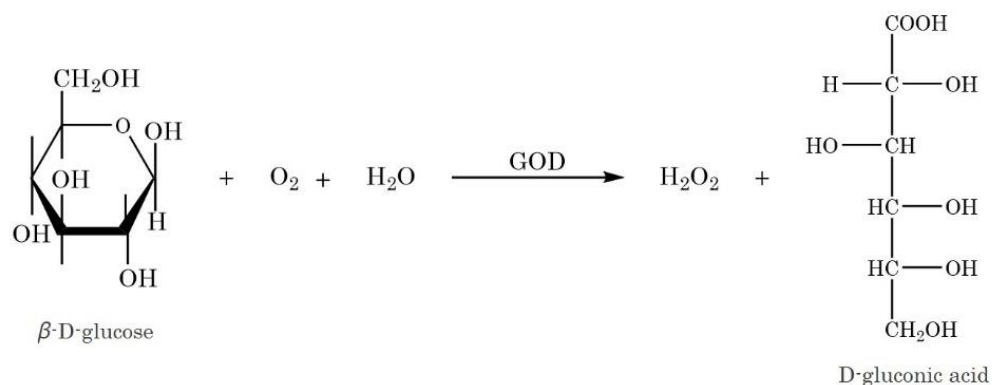
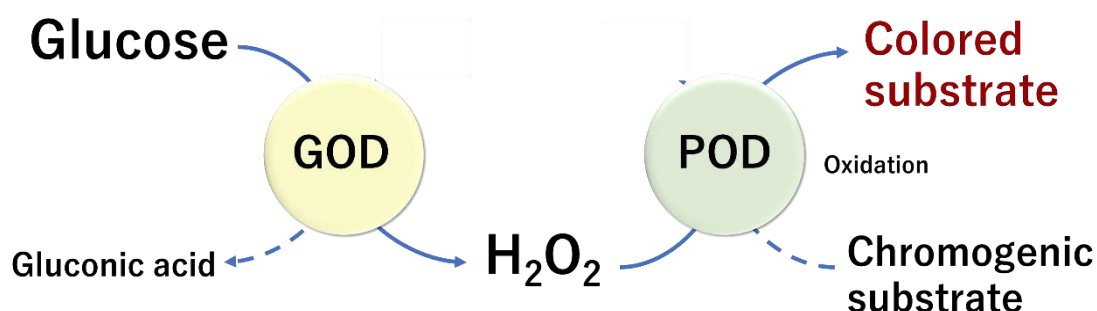


Fig. 1. Reaction of hydrogen peroxide production.

### 1-3 GOD-POD 法

血中グルコースの比色分析は一般に、グルコースオキシダーゼペルオキシダーゼ法（GOD-POD法）に従って行われる。グルコースとグルコースオキシダーゼ(GOD)が反応し、過酸化水素を生成する。この過酸化水素存在下でペルオキシダーゼ(POD)の触媒を受け、発色基質が酸化され呈色する。この基質の吸光度を測定することで過酸化水素やグルコースの定量が可能となる。



Scheme 1. Reaction mechanism of GOD-POD method.

### 1-4 PPD (p-フェニレンジアミン)

p-フェニレンジアミン(PPD)は、 $C_6H_4(NH_2)_2$ で表されるアニリン誘導体。弱酸性、中性媒体中で酸化され、暗色の 2,5-diamino-N,N'-di (4-aminophenyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-diimine (PPDox) が生じる。この機構は、HRP 活性の測定に應用されており、また理論的には  $H_2O_2$  やグルコースの検出手段としても活用することが可能である。

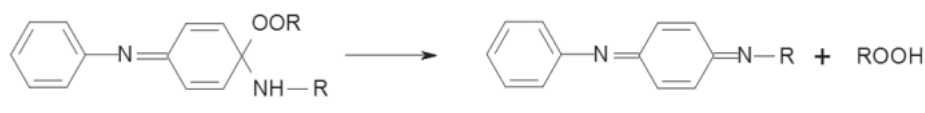


Fig. 2. Oxidation mechanism of p-phenylenediamine systems.

## 1-5 フェライト

$MFe_2O_4$  ( $M = Fe, Co, Ni, Zn, Mn$  など) の化学式を持つスピネルフェライトは、その磁氣的、磁気光学的、電子的特性のために注目されており、様々な分野でアプリケーションをもたらす。スピネルフェライトは 32 個の酸素イオンと 24 個の金属イオンを含む空間群を持つ面心立方 (fcc) 構造であり、32 個の密に詰まった酸素イオンは 64 個の四面体 (A) サイトと 32 個の八面体 (B) サイトの 2 つの下部構造を構築するが、電気的中性のために陽イオンによって捕捉されるのは 8 個の四面体 (A) サイトと 16 個の八面体 (B) サイトだけである。

$CoFe_2O_4$  はスピネルフェライトの一つであり、酸素配位子場における  $Co^{2+}$  の大きな軌道磁気モーメントにより、大きな保磁力、高い結晶磁気異方性、高いキュリー温度、優れた熱安定性などの優れた特性を備えている。

## 1-6 OSiNDs

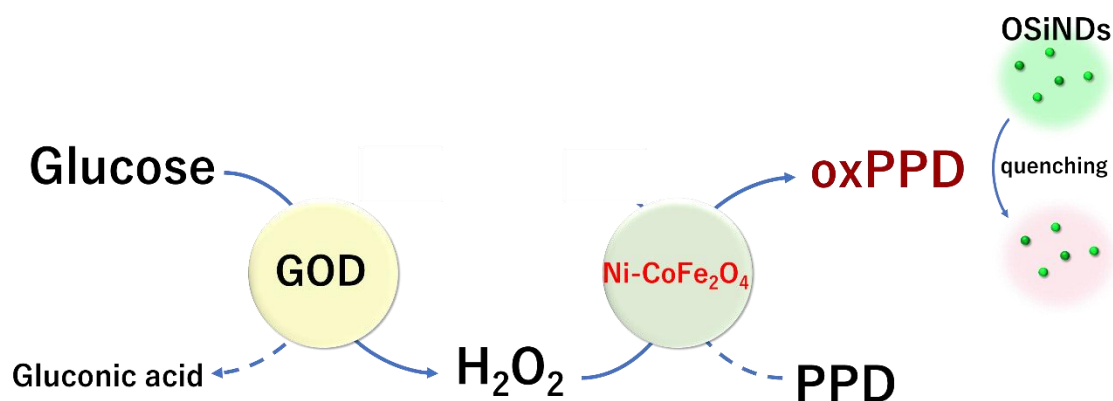
近年、半導体ナノ結晶 (量子ドット、QD) は様々な研究分野で応用されている。蛍光性有機シリコンナノドット (OSiNDs) は、その固有の特性 (強い蛍光、低毒性、強固な光安定性、保存安定性など) と応用上の利点 (良好な生体適合性、良好な生分解性など) から、有機蛍光色素や貴金属ナノ粒子などの一般的な蛍光色素の代替物質として、特に生物分野の分析研究者の注目を集めている。OSiNDs から放出される強い蛍光は、主に量子サイズ閉じ込めと表面効果に基づく間接-直接バンドギャップ遷移によって引き起こされることから、OSiNDs はバイオイメージングや太陽電池の構築への幅広い応用が期待されている。しかし、これまで OSiND は酵素触媒を用いた生体分析物の高感度検出にはほとんど応用されていない。

### 1-7 本研究の目的

先に示した GOD-POD 法において従来用いられる天然のホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) は調製、保存、再利用が困難である。よって高コスト、慎重な操作、不正確であるグルコース検出を引き起こす等の欠点がある。そのため、天然ペルオキシダーゼの代替となる人工のペルオキシダーゼ様模倣物の開発が必要とされている。

以前の研究で私達は低コストで磁気特性を持つ  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  のペルオキシダーゼ様を実証し、これを用いて比色分析によるグルコースの定量法を確立した。本研究ではこの  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  に Ni を修飾した Ni- $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  を合成し、ペルオキシダーゼ様活性の向上を試みた。

また、発色基質として PPD を使い、さらに OSiNDs の蛍光発光を利用することで、比色分析だけでなく、蛍光分析に応用してグルコースの定量を行う。



Scheme 2. Reaction mechanism in this study.

## 2 章 実験

### 2-1 試薬

・ 硫酸ニッケル(Ⅱ)六水和物	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	和光純薬工業(株)
・ 硫酸コバルト(Ⅱ)七水和物	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	和光純薬工業(株)
・ 硫酸鉄(Ⅱ)七水和物	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	和光純薬工業(株)
・ シュウ酸ナトリウム	$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	和光純薬工業(株)
・ p-フェニレンジアミン	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$	東京化成工業(株)
・ 3-[2-(2-アミノエチルアミノ)エチルアミノ]プロピルトリメトキシシラン	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$	シグマアルドリッチ
・ ローズベンガル	$\text{C}_{20}\text{H}_2\text{Cl}_4\text{I}_4\text{Na}_2\text{O}_5$	和光純薬工業(株)
・ 過酸化水素	$\text{H}_2\text{O}_2$	和光純薬工業(株)
・ 酢酸	$\text{CH}_3\text{COOH}$	和光純薬工業(株)
・ 酢酸ナトリウム	$\text{CH}_3\text{COONa}$	和光純薬工業(株)
・ D(+)-グルコース	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	和光純薬工業(株)
・ グルコースオキシダーゼ		和光純薬工業(株)
・ グルコース認証実用標準物質		(社)検査医学標準物質機構
・ スクロース	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	和光純薬工業(株)
・ マルトース	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	和光純薬工業(株)
・ ガラクトース	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	和光純薬工業(株)
・ d-フルクトース	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	和光純薬工業(株)
・ t-ブチルアルコール	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	和光純薬工業(株)
・ DMPO	$\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$	和光純薬工業(株)
・ テトラメチルピリミジン	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2$	和光純薬工業(株)

### 2.2 使用器具

・ 化学天秤	AUX 120	(株)島津製作所
・ 超音波洗浄機	SUP-10	柴田科学(株)
・ オートクレーブ	HM-19G-U	三愛科学(株)
・ マグネティックスターラー	REXIM RSH-1AR	アズワン(株)
・ ミニスターラー	TR-100	アズワン(株)
・ pH メーター	D-51	(株)堀場製作所
・ 遠心分離機 卓上小型遠心機	2410	KUBOTA(株)



## 2-3 分析機器

・紫外可視分光光度計	UV-2450	(株) 島津製作所
・分光蛍光光度計	RF-5300PC	(株) 島津製作所
・分光蛍光光度計	FP-8500	日本分光(株)
・粉末X線回折測定装置(XRD)	RINT-UltimaIV	(株) リガク
・走査型電子顕微鏡(SEM)	S-4000	(株) 日立製作所
・透過型電子顕微鏡(TEM)	JEM-1011	日本電子(株)
・BET表面積測定装置	BELPREP-vac II	BEL JAPAN(株)
・振動試料型磁力計	VSM-5	東英工業(株)
・X線光電子分光分析装置(XPS)	PHI Quantera SXM	アルバック・ファイ(株)

## 2-4 実験手順

### 2-4-1 Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> の調製

Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を沈殿法で合成した。手順を以下に示す。

1. 0.02 M NiSO<sub>4</sub> 水溶液 100 mL、0.08 M CoSO<sub>4</sub> 水溶液 100 mL、0.2 M FeSO<sub>4</sub> 水溶液 100 mL を調製し、それぞれ 80 °C で 30 分加熱攪拌した。
2. これらの溶液とあらかじめ 80 °C に加熱した 0.1 M Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 水溶液 400 mL を混合し、さらに 80 °C で 30 分加熱攪拌した。
3. 放冷後、遠心分離機で遠心分離を行い、得られた沈殿物を蒸留水で 4~5 回洗浄した。
4. 100 °C で 24 時間乾燥させた。
5. 乾燥後試料を粉砕し、るつぼに入れて電気炉で 300 °C で 2 時間焼成した。

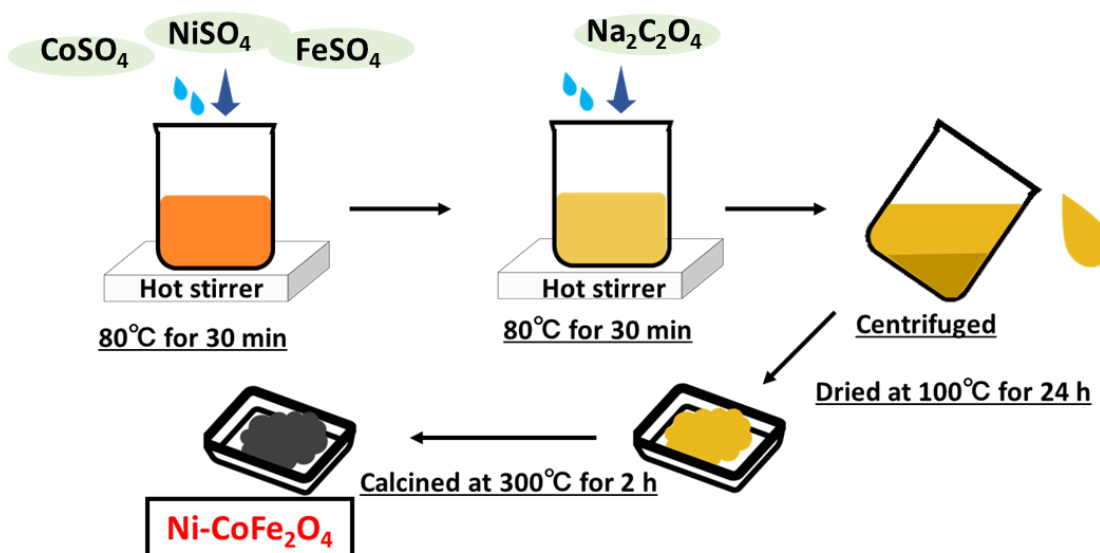


Fig. 3. Synthesis procedure for Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

## 2-4-2 OSiNDs の調製

OSiNDs を水熱法で合成した。手順を以下に示す。

1. AEEA 6 mL と 7.5 mg/mL ローズベンガル水溶液 24 mL をテフロン容器に加えた。
2. オートクレーブで 160 °C で 4 時間処理した。
3. 得られた OSiNDs は 50 倍に希釈して使用した。

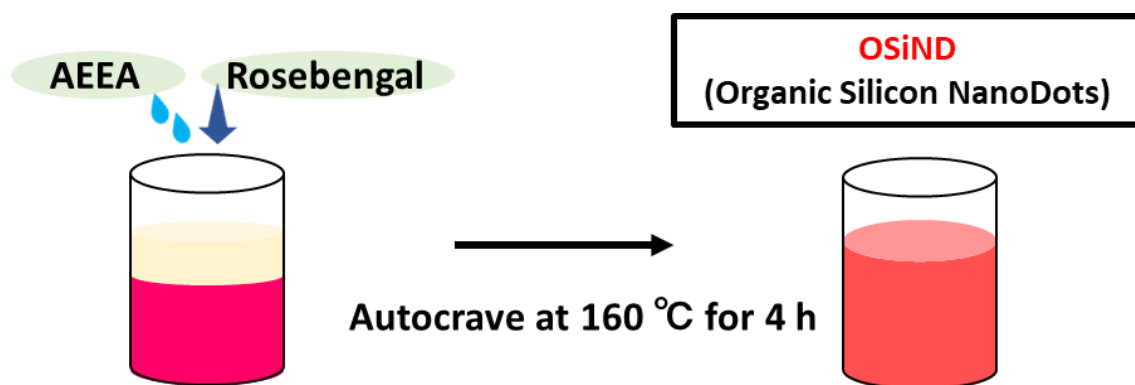


Fig. 4. Synthesis procedure for OSiNDs.

### 2-4-3 比色分析での定量実験

比色分析によるグルコースの定量は以下の手順で行った。

1. 総容量 2 mL の反応容器にグルコース 1000  $\mu\text{L}$ 、グルコースオキシダーゼ (GOD) 100  $\mu\text{L}$  を入れ、35–40  $^{\circ}\text{C}$  の湯浴中でインキュベートさせた。
2. 分取したグルコース試料を 1000  $\mu\text{L}$ 、Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 200  $\mu\text{L}$ 、PPD 400  $\mu\text{L}$ 、酢酸緩衝溶液 400  $\mu\text{L}$ 、攪拌子を入れ、マグネティックスターラーに乗せて常温で反応させた。
3. 反応後、磁石で Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を分離し、紫外可視吸光光度計で 460 nm での吸光度を測定した。

過酸化水素の定量は、1 段階目の操作を行わず、グルコース試料の代わりに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 1000  $\mu\text{L}$  加えて行った。

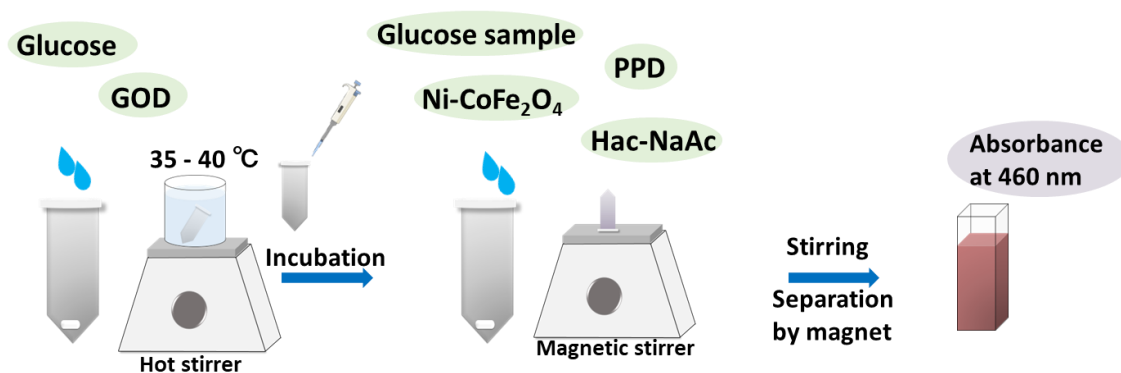


Fig. 5. Experimental Procedures by colorimetric Analysis.

### 2-4-3 蛍光分析での定量実験

蛍光分析によるグルコースの定量は以下の手順で行った。

1. 総容量 2 mL の反応容器にグルコース 1000  $\mu\text{L}$ 、グルコースオキシダーゼ (GOD) 100  $\mu\text{L}$  を入れ、35–40  $^{\circ}\text{C}$  の湯浴中でインキュベートさせた。
2. 分取したグルコース試料を 1000  $\mu\text{L}$ 、Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 200  $\mu\text{L}$ 、PPD 400  $\mu\text{L}$ 、酢酸緩衝溶液 400  $\mu\text{L}$ 、攪拌子を入れ、マグネティックスターラーに乗せて常温で反応させた。
3. 一定時間後、蛍光体 OSiNDs を加えてさらに反応させた。
4. 反応後、磁石で Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を分離し、蛍光分光光度計で 530 nm での蛍光強度を測定した。

過酸化水素の定量は、1 段階目の操作を行わず、グルコース試料の代わりに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 1000  $\mu\text{L}$  加えて行った。

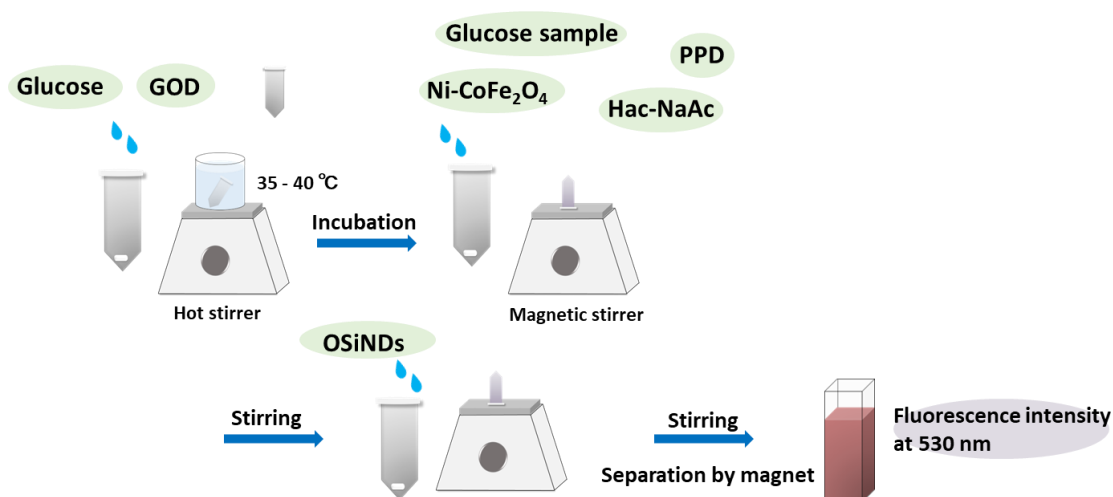


Fig. 6. Experimental Procedures by fluorescence Analysis.

また、蛍光強度を  $F$ 、グルコースまたは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度が 0 mM の時の蛍光強度を  $F_0$  とし、以下の式で得られる値を消光率 Rfd と定義した。

$$\text{Rfd (Ratio of fluorescence decrease)} = \frac{F_0 - F}{F_0}$$

### 3章 結果と考察

#### 3-1 ペルオキシダーゼ様活性

$\text{CoFe}_2\text{O}_4$  と  $\text{Ni-CoFe}_2\text{O}_4$  のペルオキシダーゼ様活性を oxPPD の吸光度で評価した。結果を図 7 に示す。触媒無しの場合での吸光度と比較して、 $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  と  $\text{Ni-CoFe}_2\text{O}_4$  を加えた場合の吸光度が増加しており、これらがペルオキシダーゼ様活性を有することが示された。また、この 2 つを比較すると、 $\text{Ni-CoFe}_2\text{O}_4$  のほうが吸光度は高く、Ni 修飾によってペルオキシダーゼ様活性が向上した。

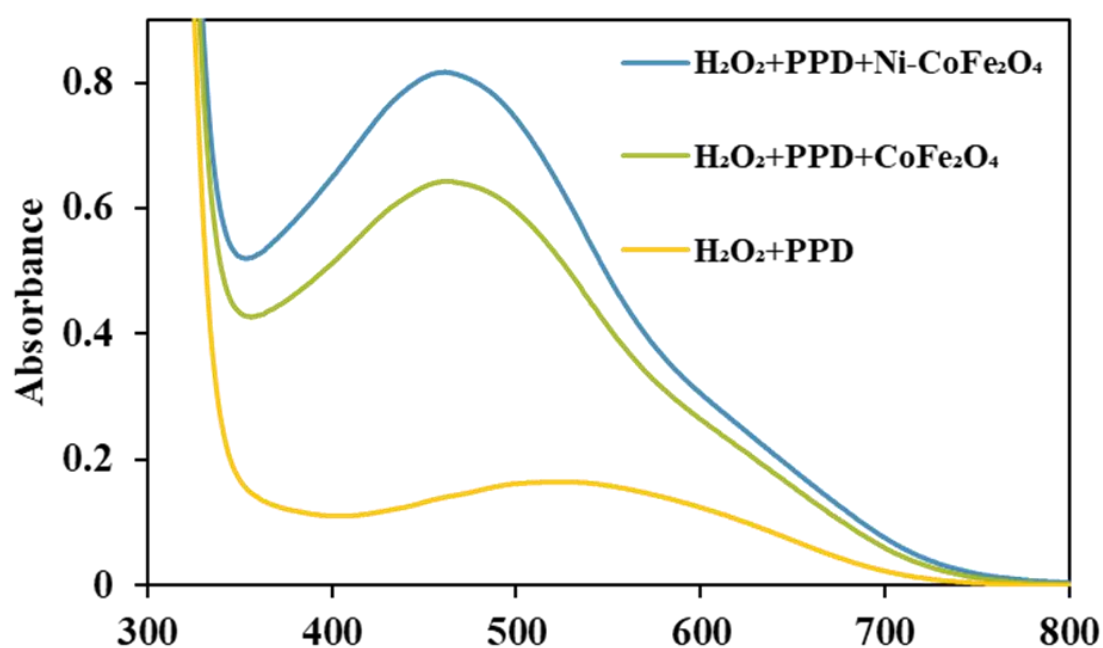


Fig. 7. Comparison of the peroxidase-like activities of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{Ni-CoFe}_2\text{O}_4$ .

### 3-2 諸条件のPPD酸化に与える影響

ここでは、 $\text{H}_2\text{O}_2$ とグルコースの検出のための反応条件を最適化した。緩衝液の pH、PPD 濃度、 $\text{Ni-CoFe}_2\text{O}_4$  濃度、反応時間の影響を調査し、最適反応条件を決定した。結果を図 8~13 に、決定された最適条件を表 1 に示す。

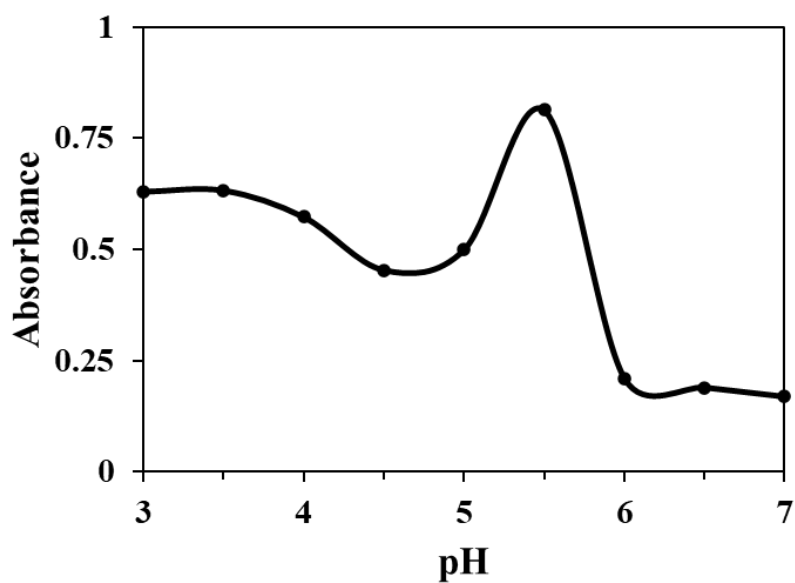


Fig. 8. Effect of pH of buffer on absorbance.

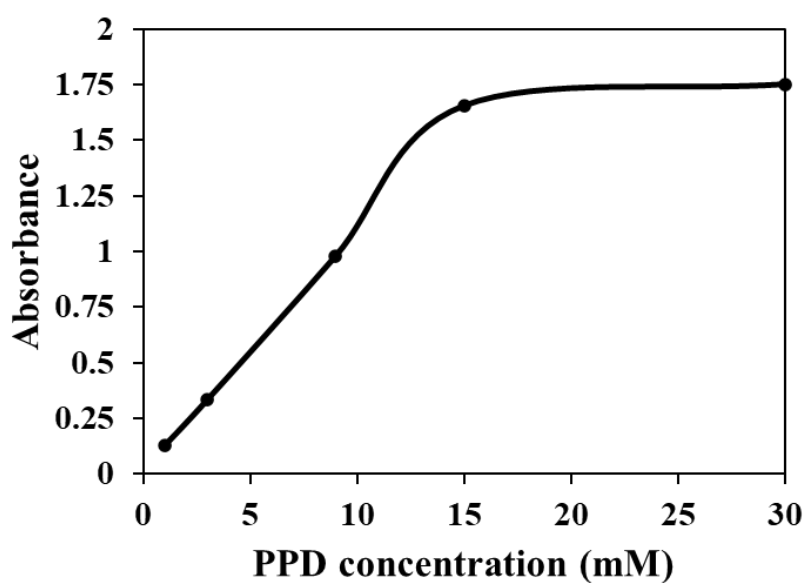


Fig. 9. Effect of PPD concentration on absorbance.

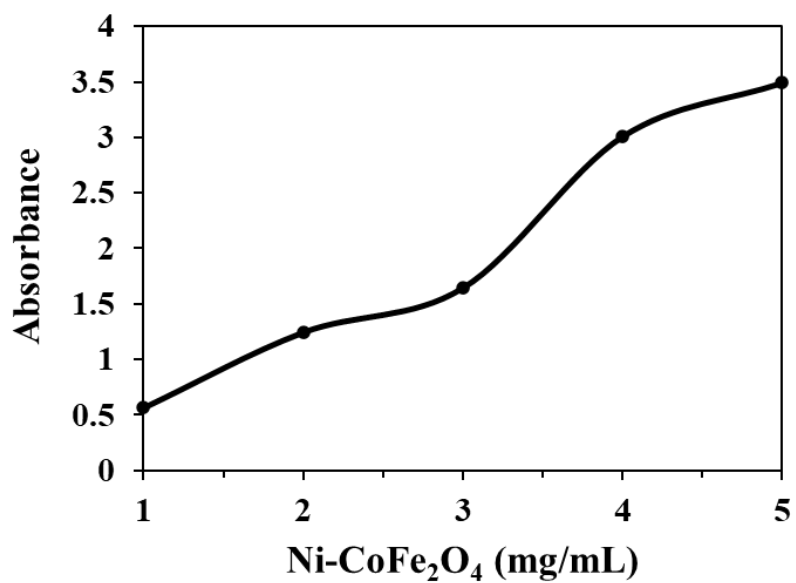


Fig. 10. Effect of Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> amounts on absorbance.

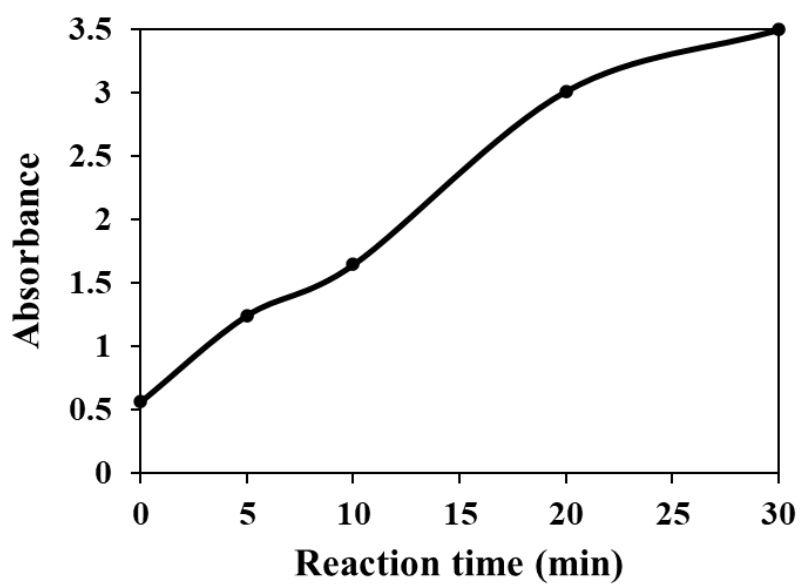


Fig. 11. Effect of reaction time on absorbance.



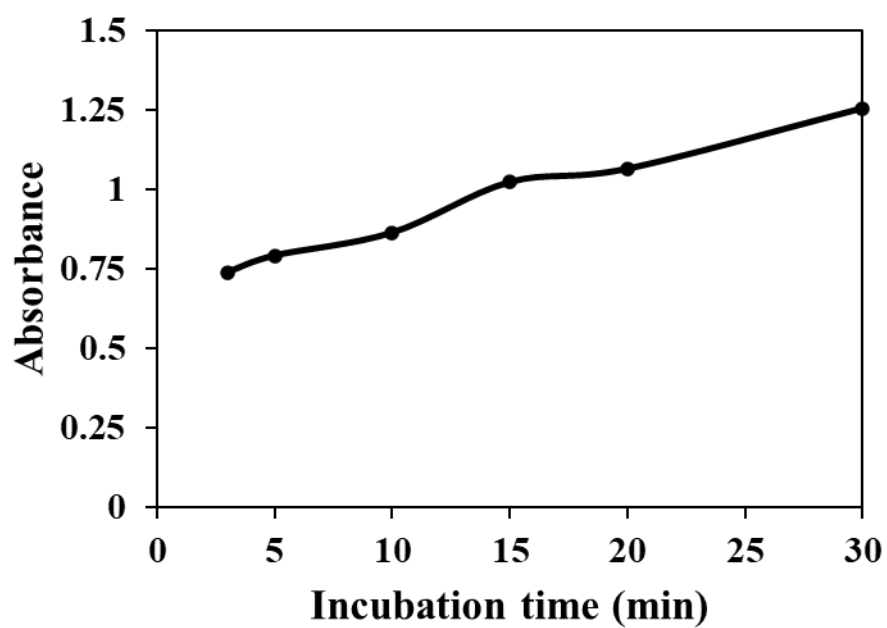


Fig. 12. Effect of incubation time on absorbance.

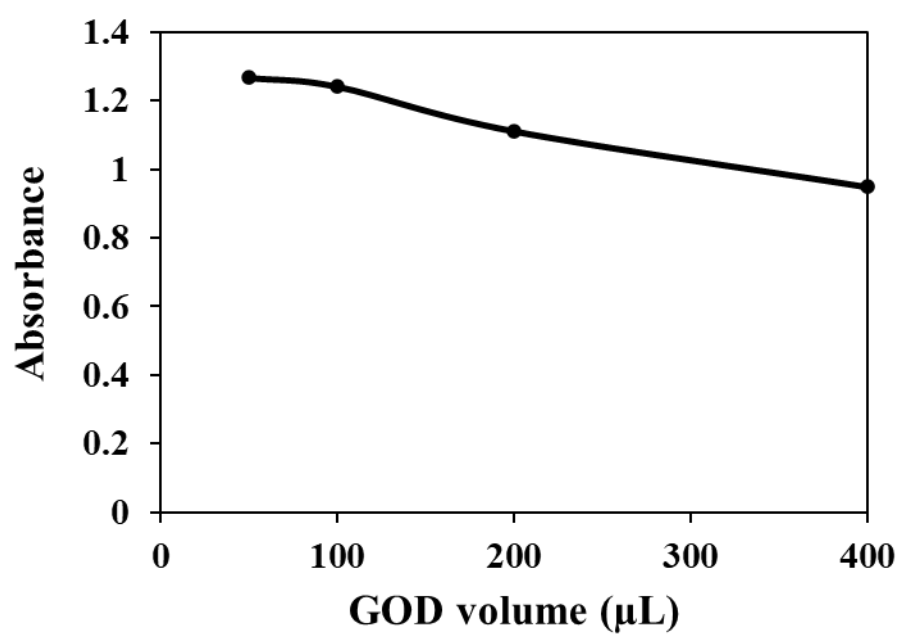


Fig. 13. Effect of GOD volume on absorbance.

**Table 1. Optimum reaction conditions.**

GOD	510 units/mL, 100 $\mu$ L
PPD	15 mM
Ni-CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	4 mg/mL
Incubation time	15 min
Reaction time	20 min
Quenching time	5 min

### 3-3 定常反応速度論分析

最適反応条件下において定常反応速度論分析を行い、Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> の PPD と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する親和性を調査した。実験は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と PPD のどちらかの濃度を固定し、もう片方の濃度を变化させて行った。吸光度の時間変化を測定し、反応速度を得た。

結果は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と PPD どちらも適切な濃度範囲で図 14 のようなミカエリスメンテン曲線を示した。この曲線の両逆数をプロットにとると図 15 の直線が得られる。ラインウィーバー・バークの式(\*)に基づいてカエリス定数( $K_m$ )と最大速度  $V_{max}$  を計算した。Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する  $K_m$  は 2.165 mM、 $V_{max}$  は 0.66mM/s であり、PPD に対する  $K_m$  は 12.48 mM、 $V_{max}$  は 1.12mM/s であった。特に、PPD に対する  $K_m$  値が低い値が得られたことから、Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> は PPD との親和性が高い。

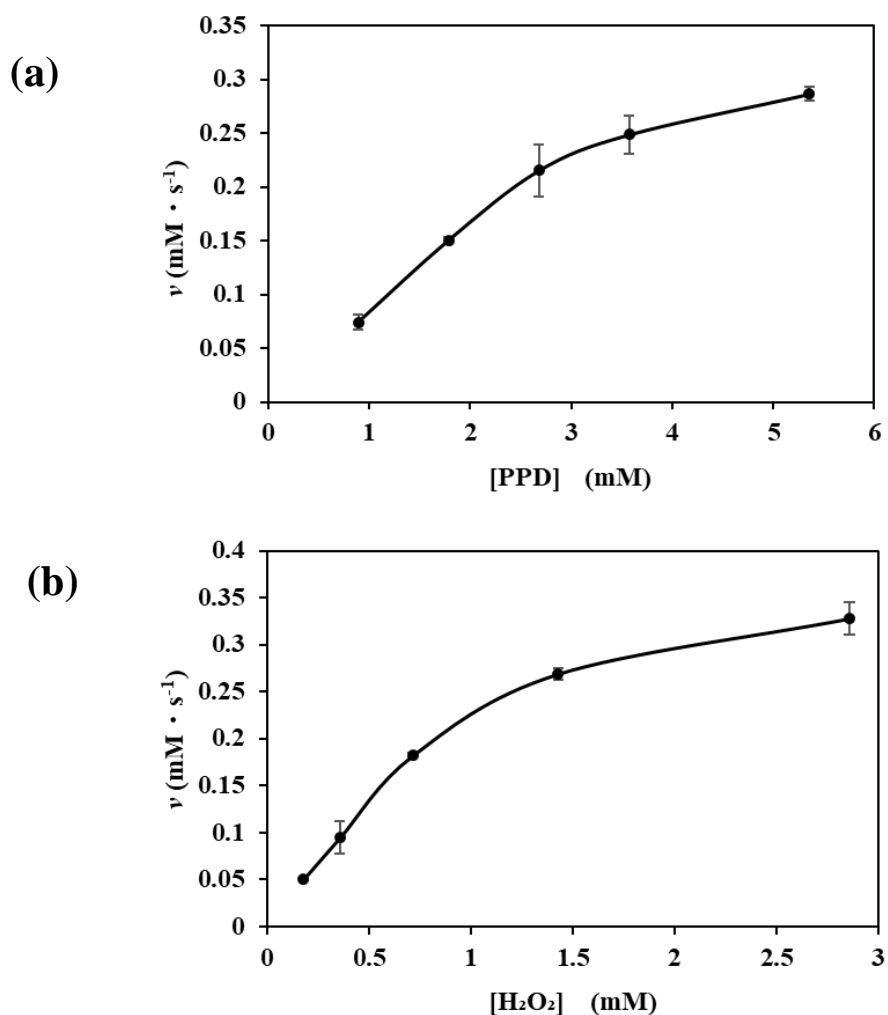


Fig. 14. Steady-state kinetic analysis utilizing the Michaelis-Menten models for Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> varied concentration of (a) PPD and (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

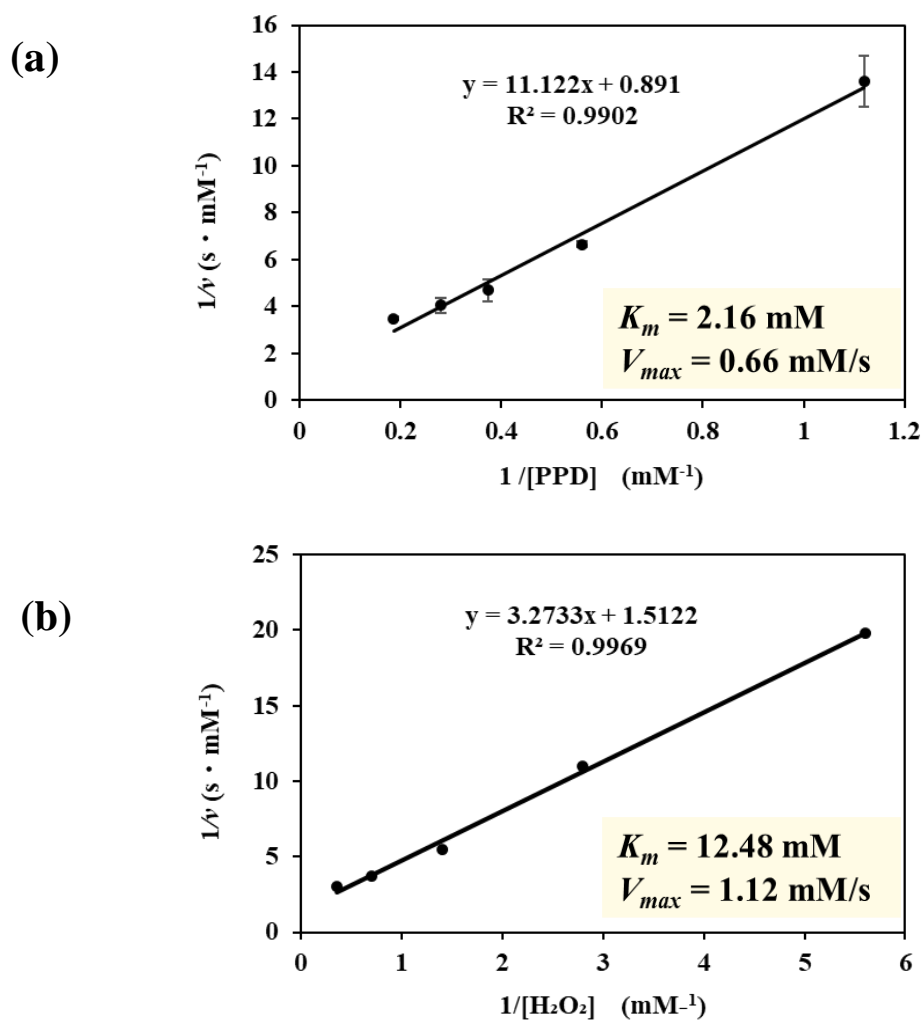


Fig. 15. Lineweaver–Burk double-reciprocal models for Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> varied concentration of (a) PPD and (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \dots (*)$$

### 3-4 蛍光体 OSiNDs の蛍光特性

有機シリコンナノドットの蛍光特性を調査した。図 16 は有機シリコンナノドットの励起・発光スペクトルと吸光スペクトルを示す。励起スペクトルと吸収スペクトルは 510 nm、発光スペクトルは 530 nm にピークを持つ。図 17 では、波長 450 nm から 510 nm の範囲で励起光を照射すると、OSiNDs は 531 nm の固定ピーク波長の緑色蛍光を発した。実験では、蛍光発光のスペクトル干渉を避けるために、励起波長として 490 nm を選択した。図 18 では、過酸化水素の濃度を变化させて蛍光強度を測定した。過酸化水素の濃度の増加に伴って OSiND の蛍光強度が減少している。図 19 は各反応系での有機シリコンナノドットの蛍光寿命を示す。明らかな差は見られず、蛍光消光が oxPPD の OSiNDs に対する内部フィルター効果(IFE)によることが明らかとなった。

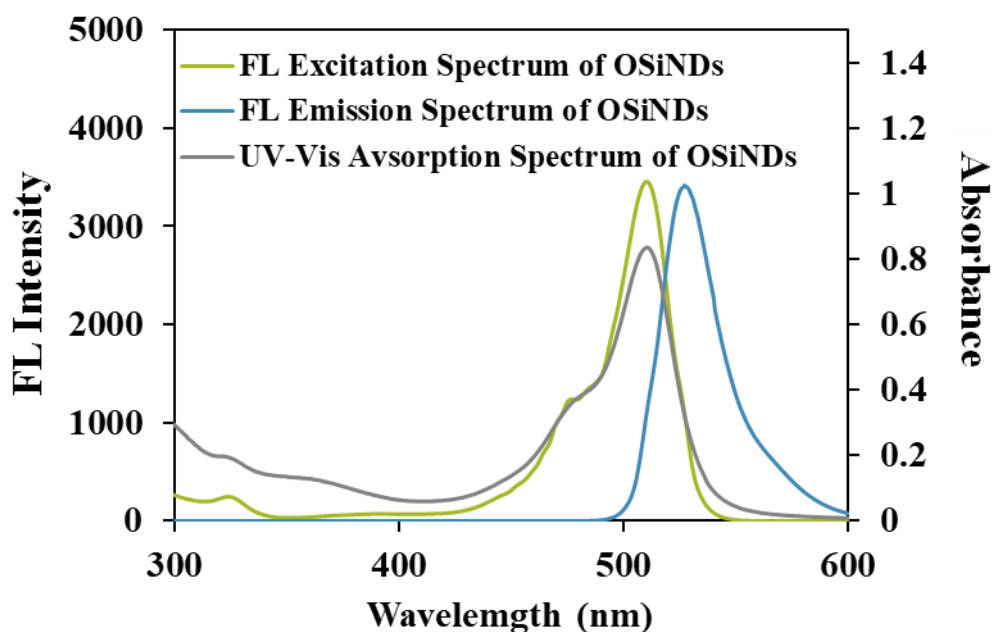


Fig. 16. Spectra of fluorescence excitation, fluorescence emission, and UV-vis absorption of OSiNDs.

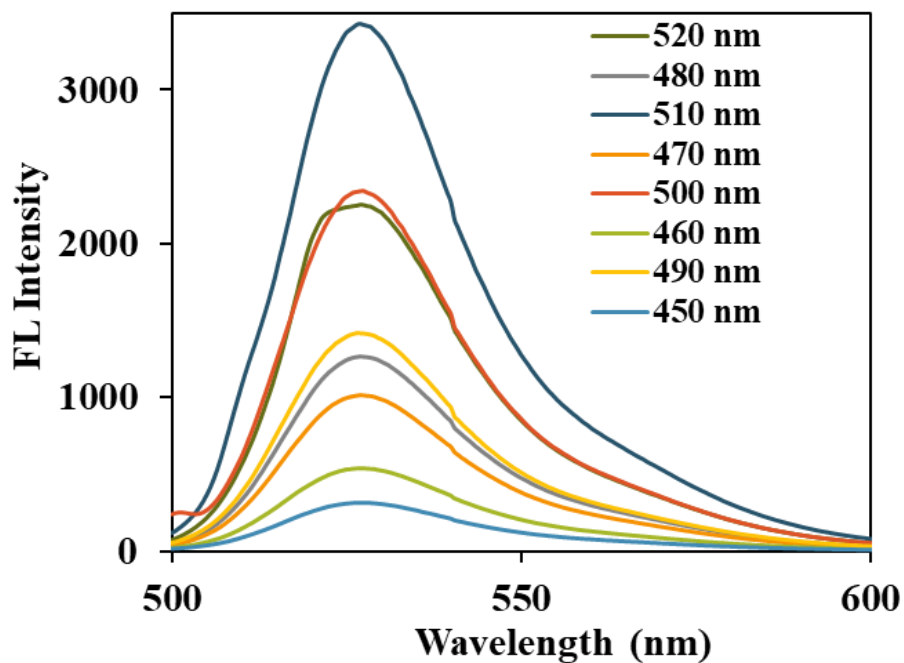


Fig. 17. Fluorescence emission spectra of OSiNDs at diverse excitation wavelengths.

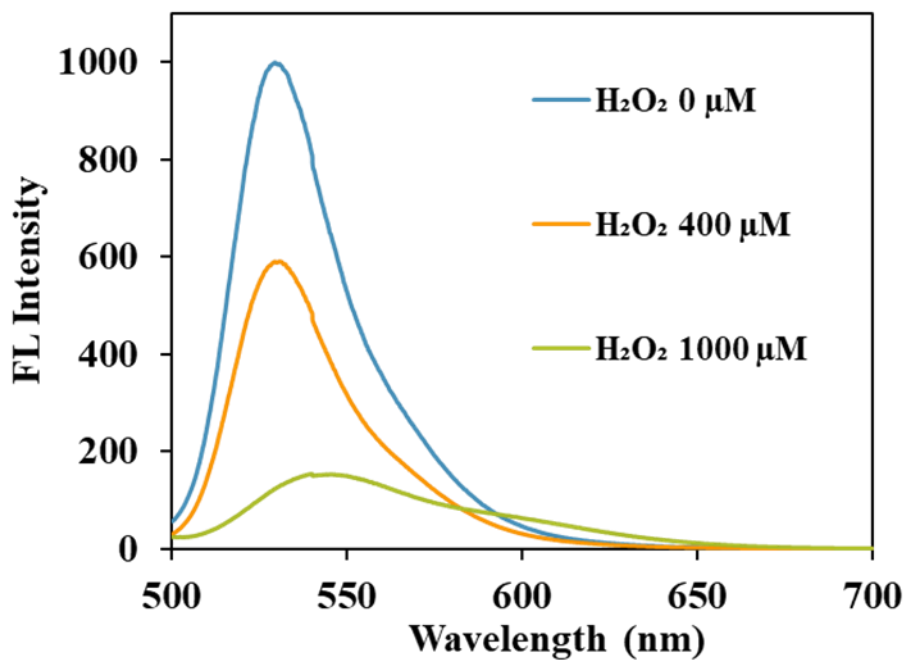


Fig. 18. Decrease in fluorescence intensity of OSiNDs with increasing  $H_2O_2$  concentration.

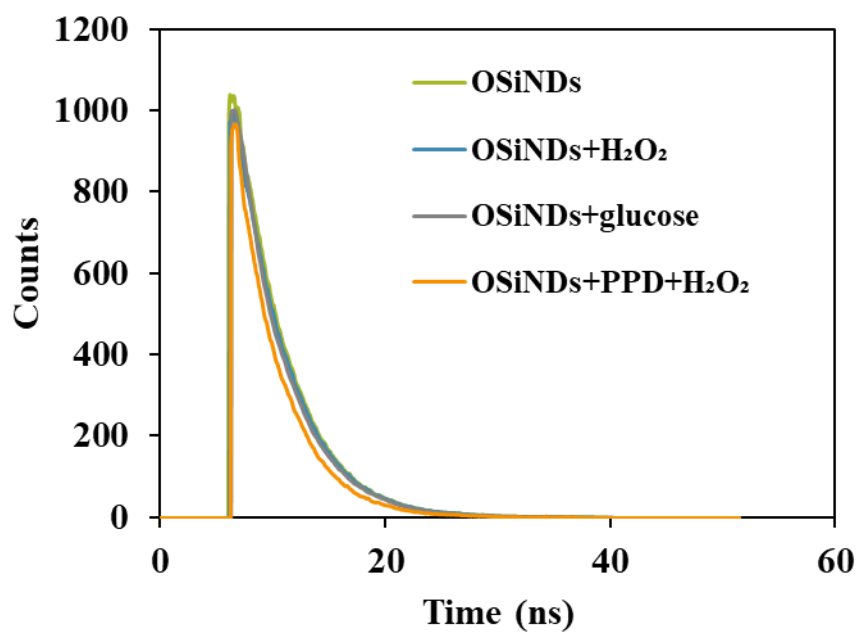


Fig. 19. Fluorescent lifetime variations of OSiNDs with different substrates.

### 3-5 検量線

最適条件下で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> とグルコースの検量線を比色分析と蛍光分析でそれぞれ作成した。検出限界は以下の式で計算を行った。

$$\text{LOD} = \frac{3\sigma}{s}$$

( $\sigma$ :ブランクの標準偏差 s:検出限界付近の検量線の傾き)

### 3-5-1 過酸化水素

比色分析、蛍光分析ともに 0~1000  $\mu\text{M}$  の範囲において直線性を得た。検出限界はそれぞれ 34.2  $\mu\text{M}$ 、26.4  $\mu\text{M}$  であった。

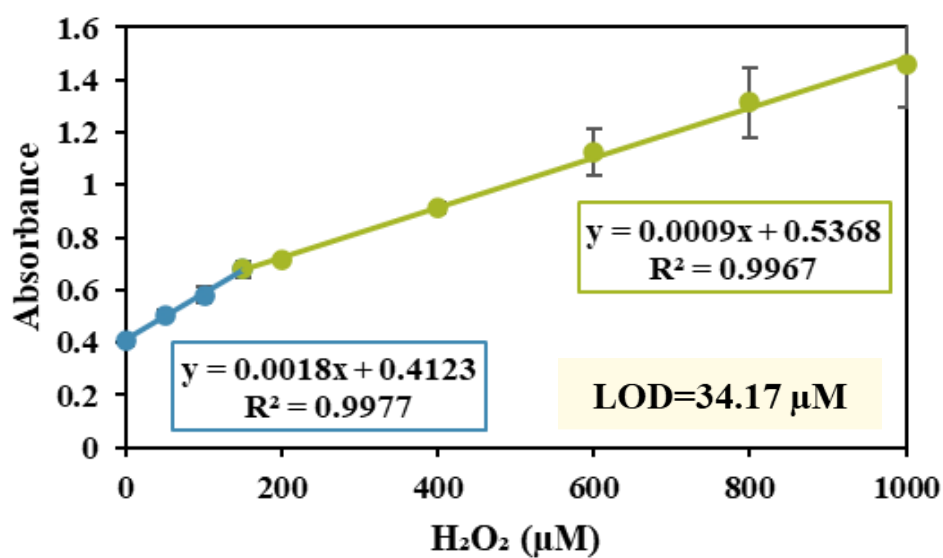


Fig. 20. Calibration curve for determination for  $\text{H}_2\text{O}_2$  by colorimetric analysis.

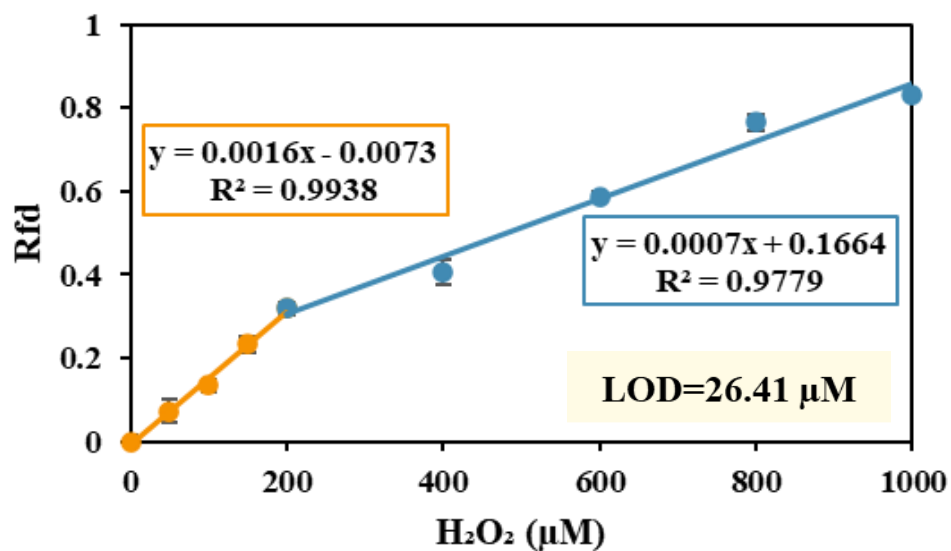


Fig. 21. Calibration curve for determination for  $\text{H}_2\text{O}_2$  by fluorescence analysis.



### 3-5-2 グルコース

比色分析は 0~1000  $\mu\text{M}$ 、蛍光分析は 0~800  $\mu\text{M}$  の範囲において直線性を得た。検出限界はそれぞれ 16.7  $\mu\text{M}$ 、19.4  $\mu\text{M}$  であった。

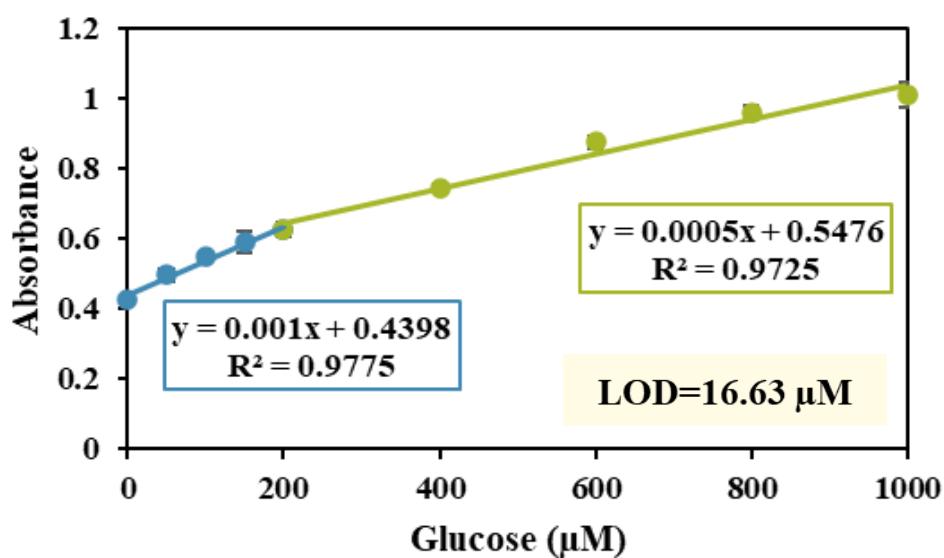


Fig. 22. Calibration curve for determination for glucose by colorimetric analysis.

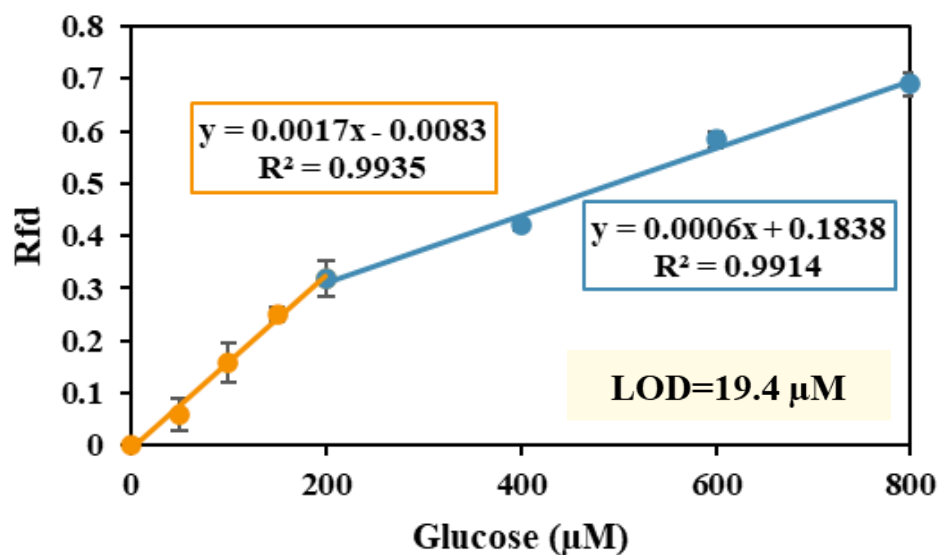


Fig. 23. Calibration curve for determination for glucose by fluorescence analysis.

### 3-6 干渉物質の影響

グルコース類似化合物の干渉について調査した。実験は、比色分析、蛍光分析ともに、最適条件下でグルコースと同濃度、同体積のこれらの化合物を加え、吸光度と Rfd を得た。

結果を図 24 に示す。類似化合物を入れた場合も、グルコースのみの場合と同等の吸光度と Rfd 値が得られ、これらの物質が本法でのグルコース定量に影響を及ぼさず、選択的であることが示された。

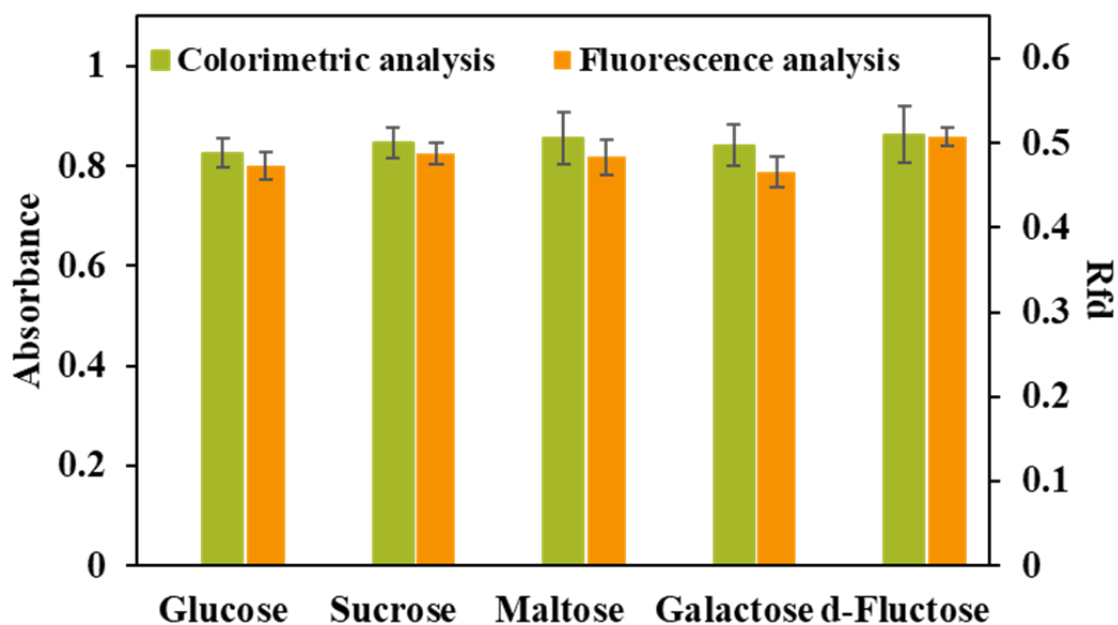


Fig. 24. Selectivity for glucose detection by monitoring the relative absorbance and Rfd.

### 3-7 実試料の測定

本法を、実試料としてヒト血清中のグルコースの定量に応用した。実験は、試料を 10 倍に希釈して行った。

結果を表 2 に示す。比色分析、蛍光分析共に実験で得られた値は認証値と近い値となり、満足のいく結果が得られた。誤差と相対標準偏差の値からも、本法が実際の血清のグルコース定量に適用できることが示された。

Table 2. Determination of glucose in human serum samples (n=4).

	Serum samples*	Certified value (mM)	Found (mM)	error (%)	R.S.D. (%) (n=4)
<b>Colorimetric analysis</b>	1	4.17	4.26 ± 0.03	2.33	4.03
	2	5.84	5.83 ± 0.01	0.21	1.71
	3	11.31	11.1 ± 0.03	1.61	3.12
<b>Fluorescence analysis</b>	1	4.17	4.47 ± 0.02	7.27	3.24
	2	5.84	5.93 ± 0.01	1.54	2.09
	3	11.31	11.1 ± 0.004	2.22	0.44

### 3-8 特性評価

合成した  $\text{Ni-CoFe}_2\text{O}_4$  の特性評価を行った。

#### 3-8-1 XRD

X線回折分析の測定結果を図 25 に示す。スピネルフェライトに由来するピークが観測され、不純物による他のピークは見られなかったことから、 $\text{Ni-CoFe}_2\text{O}_4$  が首尾よく合成できたことを示す。また、使用後の  $\text{Ni-CoFe}_2\text{O}_4$  の結晶構造は変化していなかった。

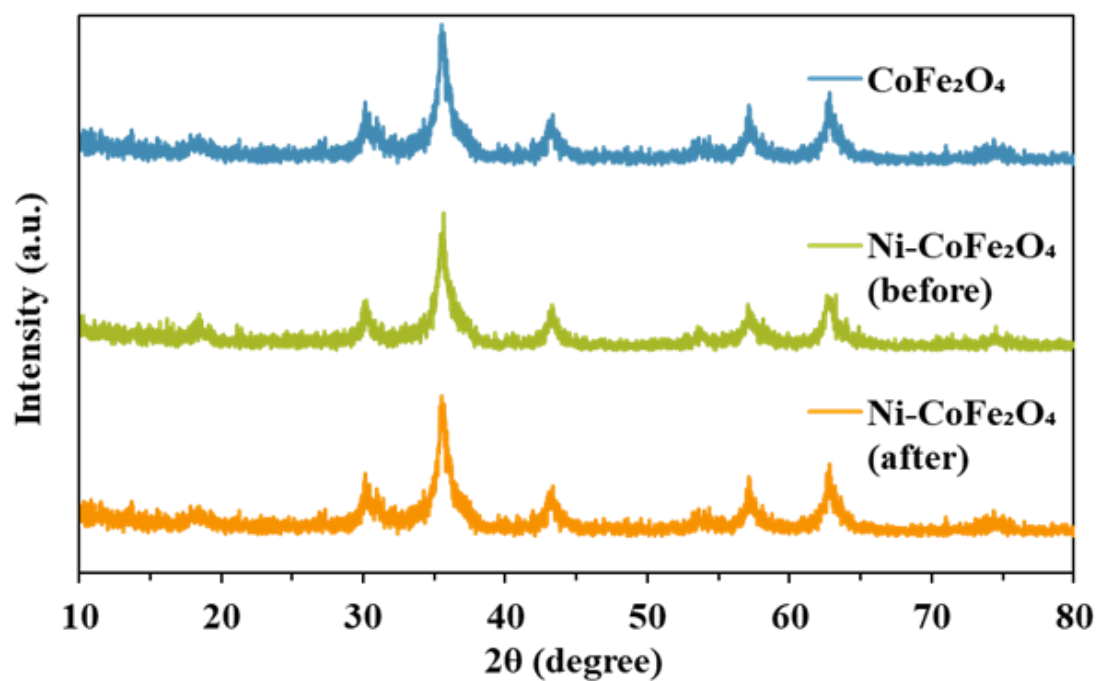


Fig. 25. XRD patterns.

### 3-8-2 SEM・TEM

SEM 像と TEM 像と TEM 像を図 26 に示す。木片状のバルクの形成が確認できた。

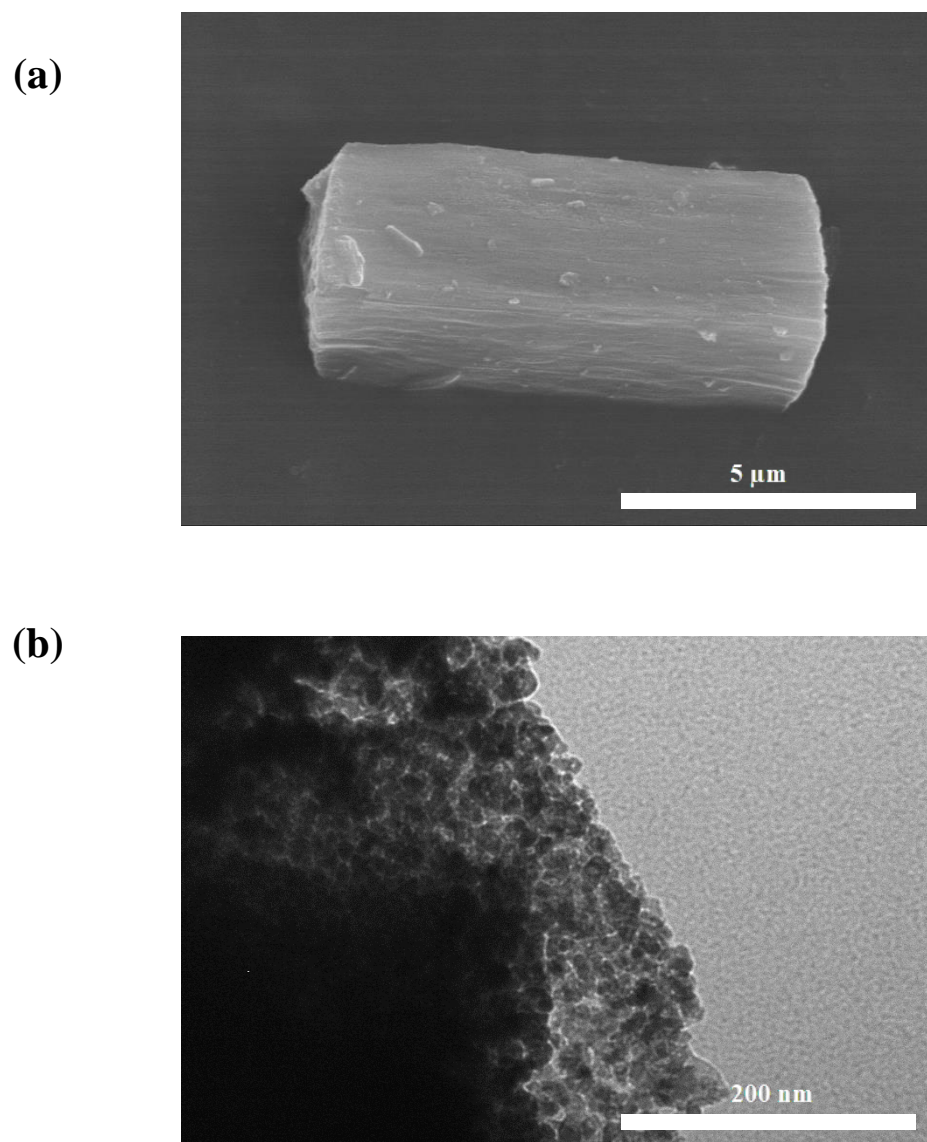


Fig. 26. (a) SEM image and (b) TEM image.

### 3-8-3 BET

窒素脱着等温線と細孔分布曲線をそれぞれ図 27,28 に示す。比表面積、全細孔容積、平均細孔直径の数値を表 3 に示す。吸脱着等温線は IV 型のヒステリシスループを示した。また、直径約 10 nm 以下の細孔が最も多く存在する。Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> と CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を比較し、大きな差は見られなかった。

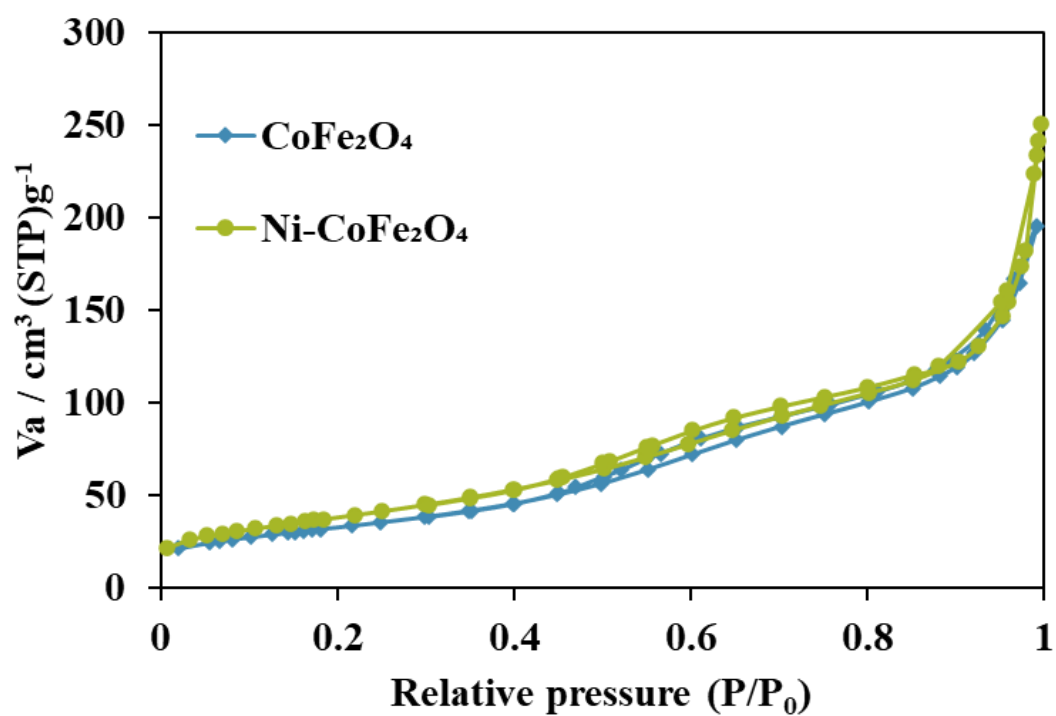


Fig. 27. N<sub>2</sub> absorption - desorption isotherms.

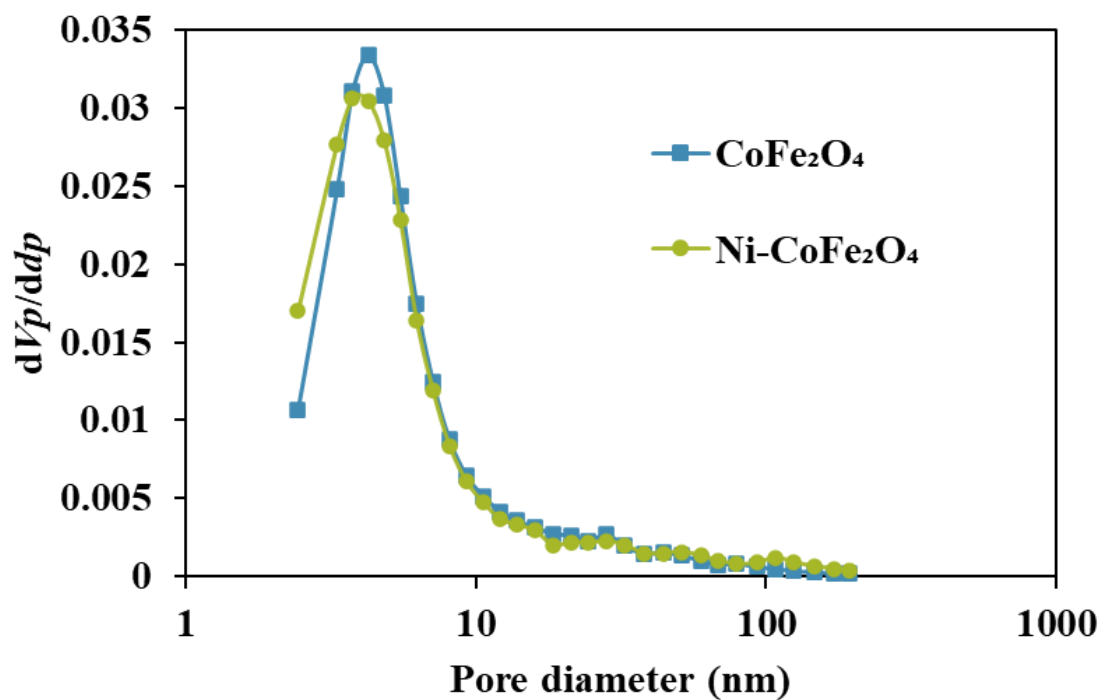


Fig. 28. Pore size distributions.

Table. 3 Surface area, total pore volume and average diameter.

	$S_{\text{BET}}$ [ $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ ]	$V_p$ [ $\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ ] ( $p/p_0 = 0.990$ )	$d_p$ [nm]
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	122.4	0.298	4.25
Ni-CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	143.0	0.346	3.75

### 3-8-4 VSM

VSM 測定によって Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> の磁性を調査した。結果を図 29、表 4 に示す。Ni を修飾したことにより、保持力、残留時価、飽和磁化の値が増加した。また、CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>、Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ともに強磁性を示すため、吸光度、蛍光強度の測定時に磁石で分離することができる。

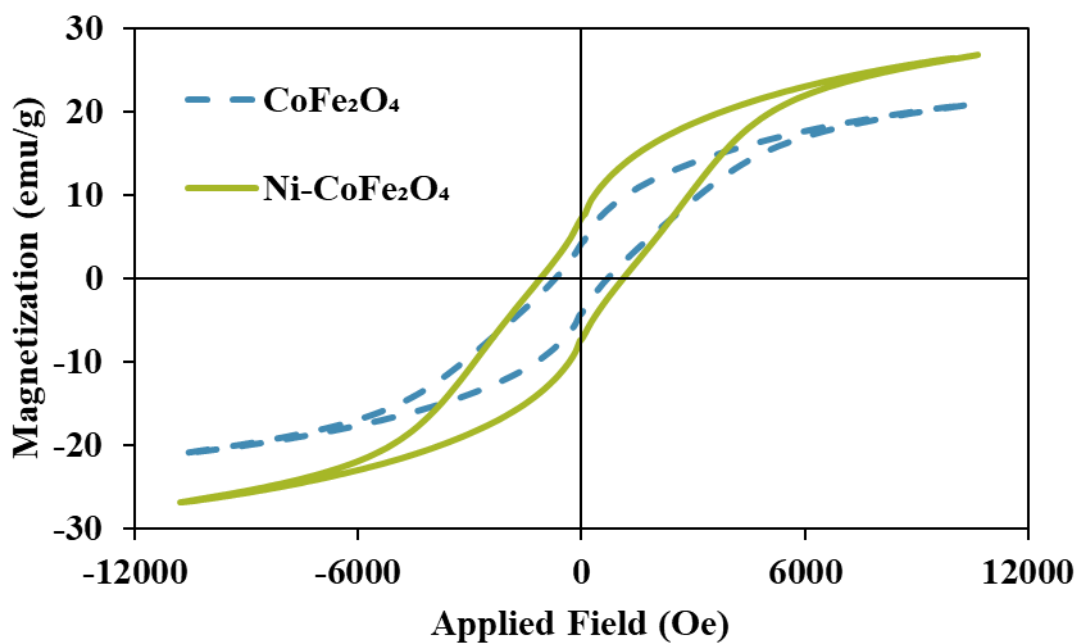


Fig. 29. Magnetic hysteresis (M-H) loops of spinel.

Table. 4 Variation of coercivity, remanent magnetization and saturation magnetization of spinel.

	$H_s$ (Oe)	$M_r$ (emu/g)	$M_s$ (emu/g)
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	720.7	4.196	21.02
Ni-CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1117	7.263	26.91



### 3-8-5 XPS

XPS サーベイスpekトルを図 30 に示す。Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> にのみ Ni のピークが観測され、Ni 修飾ができたことを示す。また、Ni, Co, Fe の元素比を表 5 に示す。合成時の前駆体のモル比とほぼ一致していた。

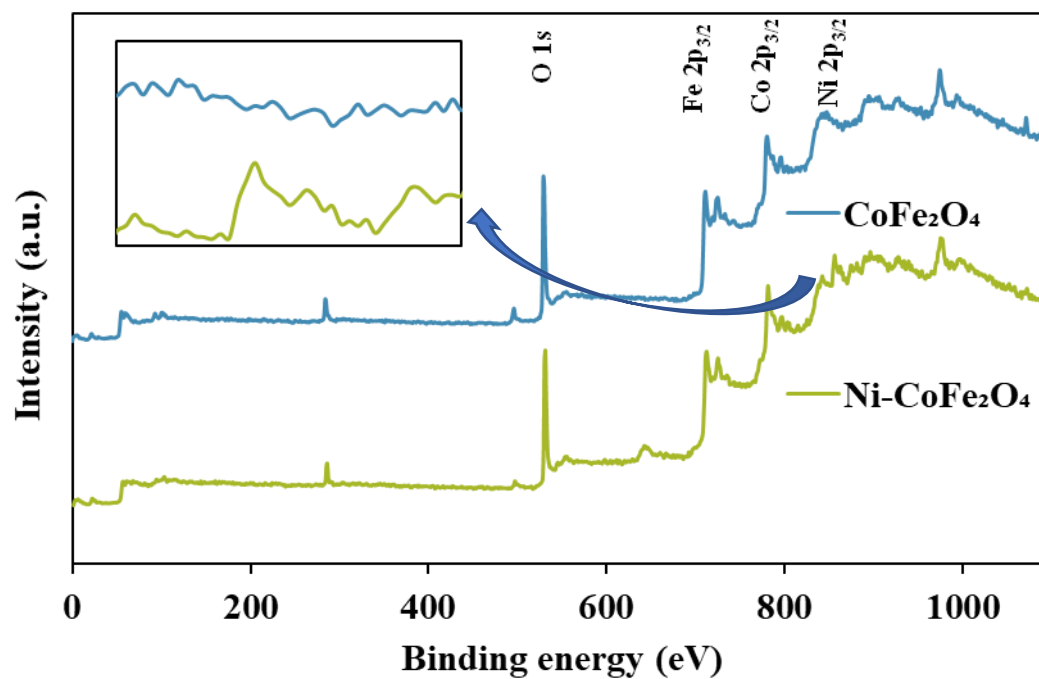


Fig. 30. XPS survey spectra.

Table. 5 Ratios of chemical species of Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

	Fe (mol)	Co (mol)	Ni (mol)
Ni-CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	2.000	0.805	0.221

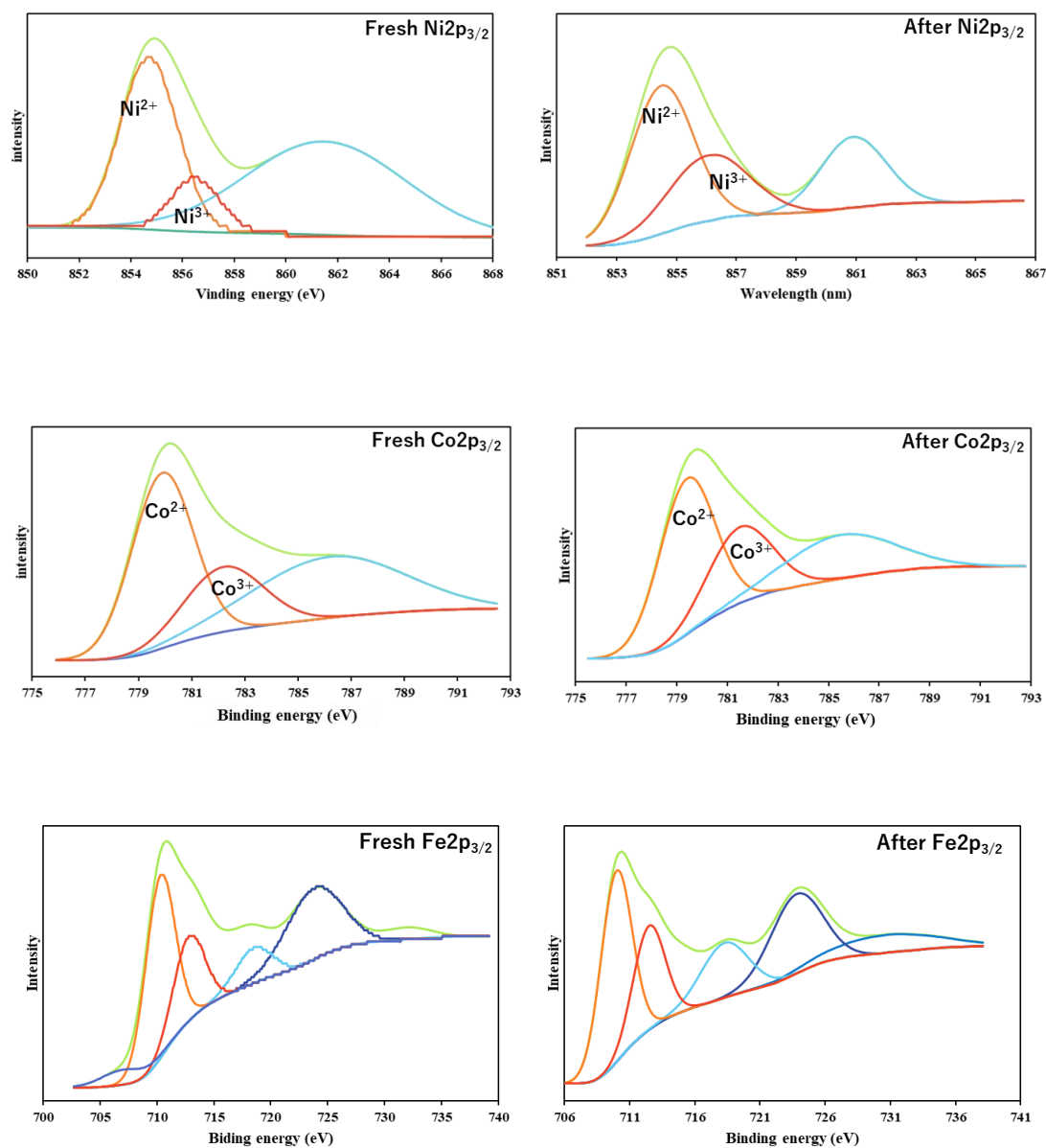


Fig. 31. XPS spectra of Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

## 3-9 ESR

PPD 酸化のメカニズムを解明するため、ESR 測定を行った。 $\cdot\text{OH}$  の存在は反応系の PPD の代わりに DMPO を、直接酸化の確認は PPD の代わりにテトラメチルピリミジンを加えて過酸化水素存在下、非存在下で反応させた。

測定結果を図 32 に示す。 $\cdot\text{OH}$  のピークが観測され、PPD 酸化の活性種であることが確認された。

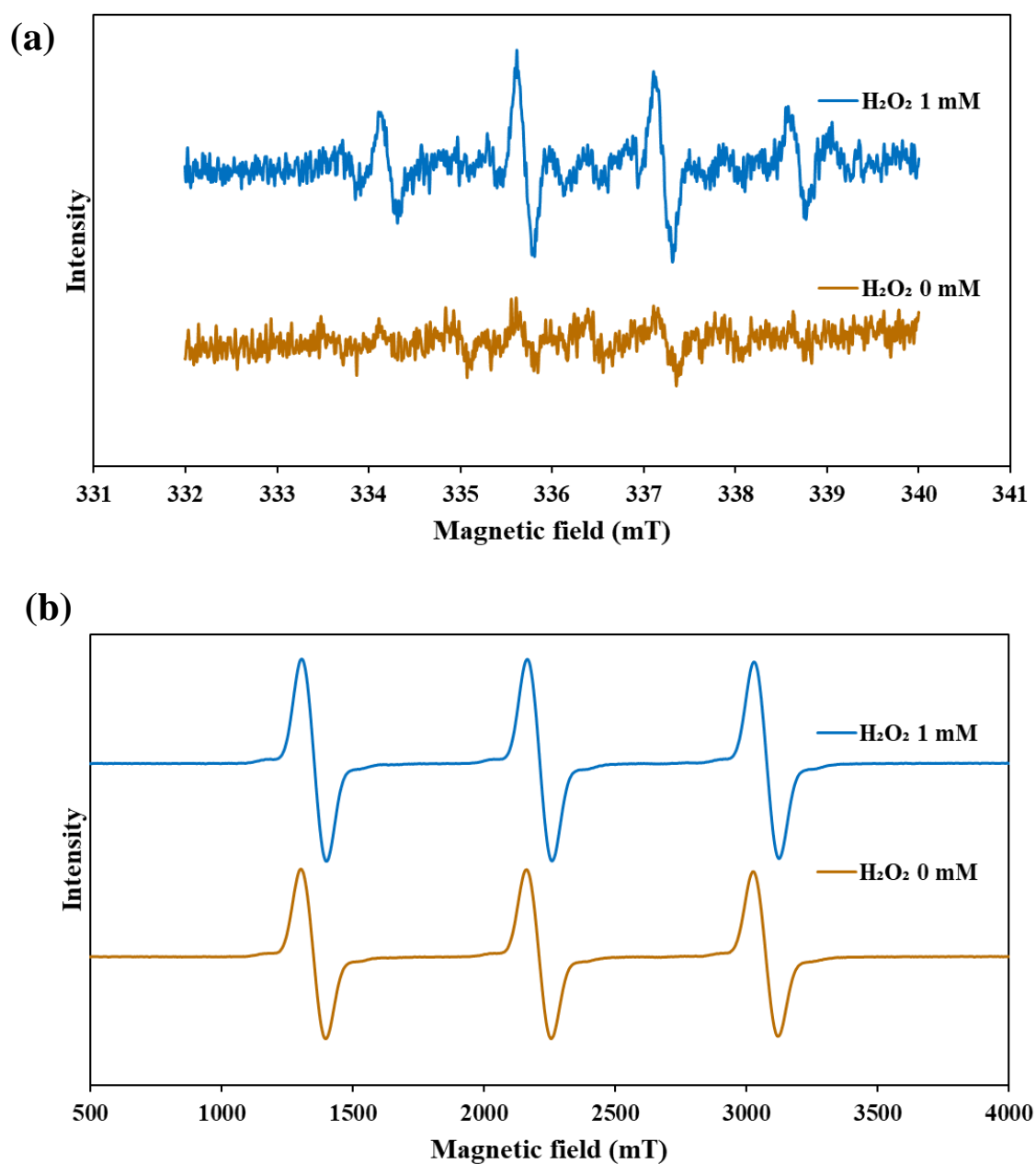


Fig. 32. Spin-trapping ESR spectra for DMPO- $\cdot\text{OH}$  (b) Oxidized tetramethylpyrimidine.

## 3-10 メカニズム

XPS と ESR 測定の結果より考えられる 2 通りの触媒メカニズムを以下に示す。

(a)では、Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>中の 3 価の Co, Ni が過酸化水素に電子を渡すことで 2 価となり、過酸化水素から・OH が生成される。その・OH が PPD を攻撃することで酸化 PPD となり呈色する。また、2 価となった Co は 2 価の Ni によってふたたび 3 価へ戻される。このメカニズムによって、グルコースや過酸化水素の定量的な PPD 酸化が起こる。

また、(b)では、PPD が酸化されるメカニズムとして Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>による直接酸化も考えられる。このオキシダーゼ様活性によってブランク時の呈色が起こっていると考えられる。

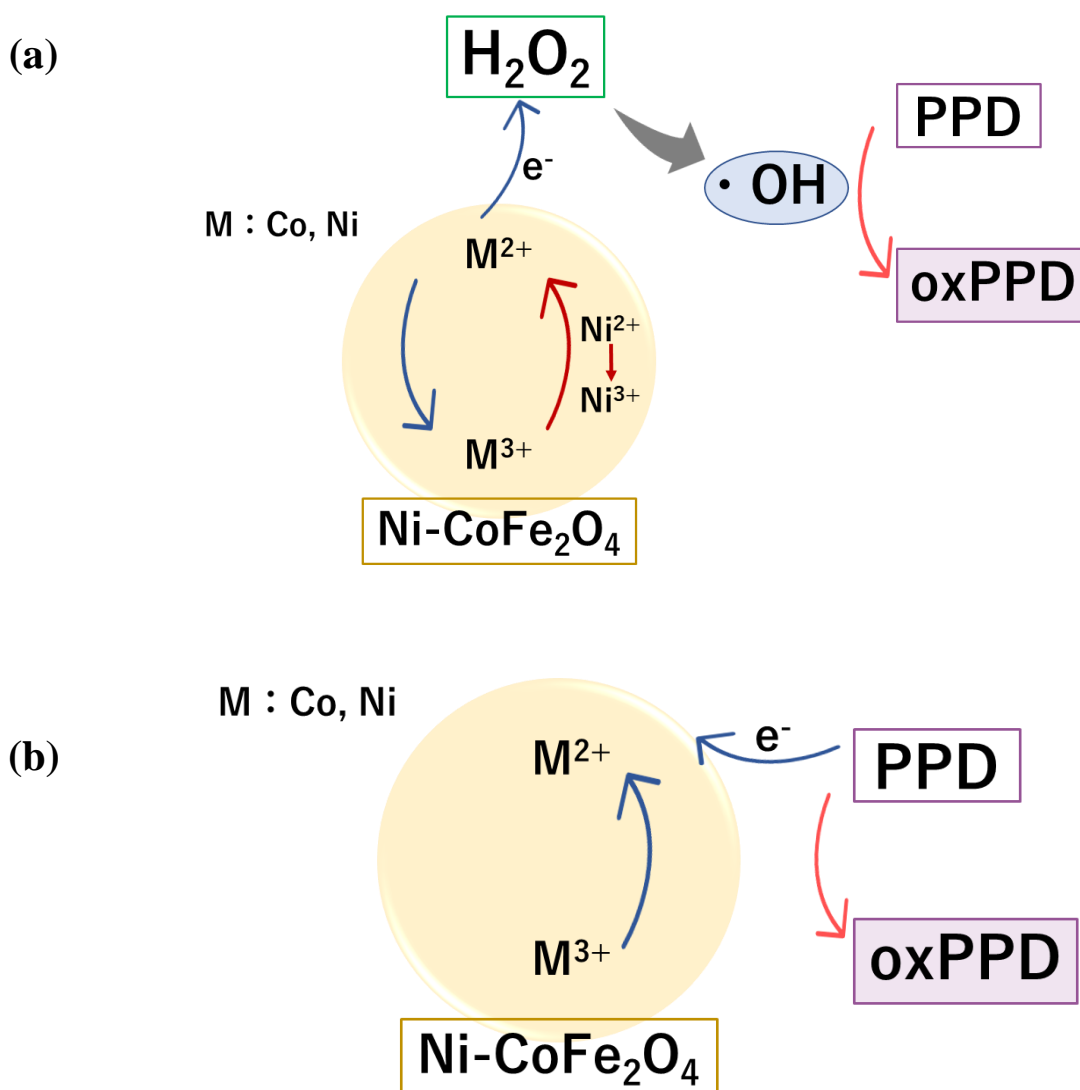


Fig. 33. Catalytic mechanism of PPD oxidation (a)  $\cdot\text{OH}$  and (b) direct oxidation by Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

## 4 章 結論

本研究において、簡便な沈殿法で磁性 Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を合成し、そのペルオキシダーゼを実証した。CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> と比較して、Ni を修飾したことでペルオキシダーゼ様活性の向上に成功した。

また、発色基質として PPD を採用し、蛍光体 OSiNDs を用いることで酵素基質の比色・蛍光分析法について検討し、グルコースの定量法を確立した。本法をヒト血清中のグルコースの定量に適用し、満足のいく値が得られたことで、本法の実用可能性を示した。

## 参考文献

1. “Graphene oxide and CuO double quantum dot composites (GOQD-q-CuO) with enhanced haloperoxidase-like activity and its application in colorimetric detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and glucose”  
T. Guo, T. Xu, W. Xia, A. J. Carrier, L. Wang, X. Zhang  
Materials Chemistry and Physics Volume 260, 2021, 124126.
2. “Cu-CDs/ $\text{H}_2\text{O}_2$  system with peroxidase-like activities at neutral pH for the co-catalytic oxidation of o-phenylenediamine and inhibition of catalytic activity by Cr(III)”  
D. Yang, Q. Li, S. Kumar Tammina, Z. Gao, Y. Yang  
Sensors and Actuators B: Chemical Volume 319, 2020, 128273.
3. “Peroxidase-like and oxidase-like nanozyme activities of reusable Mn-Co-S-Se/Ni foam for antibacterial application”  
Y. Lian, Y. Wang, D. Zhang, L. Xu  
Colloids and Surfaces A Volume 626, 2021, 127010.
4. “FeS nanoparticles embedded in 2D carbon nanosheets as novel nanozymes with peroxidase-like activity for colorimetric and fluorescence assay of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and antioxidant capacity”  
C. Song, H. Liu, L. Zhang, J. Wang, C. Zhao, Q. Xu, C. Yao  
Sensors and Actuators B: Chemical, 353, 2022, 131131.
5. “ $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ /CNTs fabricated by atomic layer deposition as highly stable peroxidase mimics for sensitive colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose”  
L. Wu, X. Zhou, G. Wan, S. Shi, G. Wang  
Materials Research Bulletin, 147, 2022, 111637.
6. “Quantum dots and p-phenylenediamine based method for the sensitive determination of glucose”  
X. Lv, X. Wang, D. Huang, C. Niu, G. Zeng, Q. Niu  
Talanta, Volume 129, 2014, 20-25.
7. “The peroxidase-like catalytic activity of in situ prepared cobalt carbonate and its applications in colorimetric detection of hydrogen peroxide, glucose and ascorbic acid”  
L. JingPeng, C. YanZhang, W. YiZhang, H. YuZhou, F. QingYang  
Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Volume 651, 2022, 129744.

8. “Rutin as a coenzyme of Fe-doped silicon nanozyme with enhanced peroxidase-like activity for a colorimetric  $\beta$ -glucuronidase sensor”  
S. He, H. Yang, L. Yang, H. Noreldeen, H. Peng, H. Deng, W. Chen, G. Hong  
Microchemical Journal, 181, 2022, 107771.
9. “Colorimetric and Fluorescent Dual-Mode Measurement of Blood Glucose by Organic Silicon Nanodots”  
D. Li, N. Li, L. Zhao, S. Xu, Y. Sun, P. Ma, D. Song, X. Wang  
ACS Appl. Nano Mater. 2020, 3, 11, 11600–11607.
10. 酵素反応速度論  
<https://idenwatch.com/seikagaku8-3/#KmVmax>
11. アミン系老化防止剤  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/gomu/91/12/91\\_442/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/gomu/91/12/91_442/_pdf/-char/ja)

本研究に関する論文

1. “Determination of glucose in sera samples using magnetic catalyst with peroxidase-like activity”, M. Shibata, H. Katsumata, M. Furukawa, I. Tateishi, S. Kaneco, 18th Japan-Korea Symposium on Catalysis (2021), P49.
2. “Determination of hydrogen peroxide by PPD oxidation using Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>”, M. Shibata, H. Katsumata, M. Furukawa, I. Tateishi, S. Kaneco, The 9th Tokyo conference on Advanced Catalytic Science and Technology (2022), P2029.
3. “Determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with PPD oxidation using Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>”, M. Shibata, H. Katsumata, M. Furukawa, I. Tateishi, S. Kaneco, 12th International Conference on Environmental Catalysis (2022), P163.
4. “Ni-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を利用する PPD 酸化によるグルコース定量法”, 柴田 舞子, 勝又 英之, 立石 一希, 古川 真衣, 金子 聡, 第 53 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (2022), 2G12.



## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導並びにご教授をいただきました金子聡教授、勝又英之准教授、立石一希助教、古川真衣技術職員に厚く御礼申し上げます。また、研究室の諸先輩及び同級生各位におかれましても、ご協力、ご助言を頂戴し、公私を問わずお世話になりましたことを深く感謝申し上げます。