

カテキン分子鑄型薄膜水晶振動子センサによる カテキンのフローインジェクション分析

齋藤 貴^{1,*}

¹ 神奈川工科大学工学部応用化学科：243-0292 神奈川県厚木市下荻野 1030

Flow Injection Analysis of Catechin Using a Quartz Crystal Microbalance Sensor Coated with Catechin Molecular-Imprinted Membrane

Takashi Saito

Faculty of Engineering, Department of Applied Chemistry, Kanagawa Institute of Technology,
1030 Shimoogino, Atsugi City, Kanagawa 243-0292, Japan

Recently, many kinds of drinking water which contains catechins are being marketed. Catechins has bioactivity for anticancer, prevention of aging action, rise in blood pressure restraint, and so on. So, a high sensitive and high selective analytical method is required in order to manage the quality of foods with quickness. Based on molecular-imprinting method, (+)-catechin-nylon 6 thin membrane was prepared using (+)-catechin as a template molecule and nylon 6 as a host molecule. The obtained thin membrane was coated on a gold electrode of a quartz crystal microbalance (QCM), which was of 30 MHz, AT cut, and dual channel type. Thus prepared QCM sensor was attached into a flow cell as a detection port on a flow analysis. After a (+)-catechin sample was applied to the QCM flow analysis system, the (+)-catechin concentration was determined based on the decrement of frequency of the QCM. Adsorption selectivity of the prepared (+)-catechin-imprinted thin membrane was evaluated using (+)-catechin, (-)-epigallocatechingallate, (-)-epicatechin, caffeine, catechol, and so on. It was found that the (+)-catechin was detected with high selectivity, because the response of other guest molecules did not occur. A proportional relation between the (+)-catechin concentration and the decreased amount of frequency was obtained in the range of the concentration from 0 to 50 mg/L. The detectable limit concentration of (+)-catechin was 0.263 mg/L. Furthermore, the concentration of (+)-catechin by this analytical system agreed well with that by conventional liquid chromatographic analysis for commercial green tea drinks.

Keywords (+)-catechin, quartz crystal microbalance, molecular-imprinted membrane, nylon 6, flow injection analysis

1. 緒 言

カテキン類はフラボノイドの1種であり、多種の生理活性作用があることが報告されている。たとえば、血圧上昇抑制作用、血中コレステロール調節作用、老化抑制作用、血糖値調節作用、抗酸化作用、抗菌、抗アレルギー作用、抗がん予防など、多数の効能が報告されている[1-4]。近年の人々の健康意識の高まりにより、生理活性の高いカテキン類が注目されている。これらを背景に、健康改善や維持の目的でカテキン類を多量に含む食品や飲料水などが市販されている現状にある。茶葉には、遊離型の(-)-エピカテキンや(-)-エピガロカテキン、エステル型の没食子酸エステルである(-)-エピカテキンガレートと(-)-エピガロカテキンガレート、さらに、(+)-カテキン、(+)-ガロカテキンなど多種のカテキン類が含まれている。

また、茶葉から緑茶成分を加熱抽出して飲料する場合や茶飲料を製造する工程で抽出・殺菌処理を行う場合などの

熱処理過程において、上記の主要成分において、一部がエピマー化し、(-)-カテキンや(-)-ガロカテキンガレートに変化することが知られている[5-9]。特にこのエピマー化は焙じ茶製造時や茶飲料の製造時(121℃, 3~13分)に顕著である[10-12]。カテキン成分が茶飲料を通してヒトの体内に取り込まれることで、上述の各種効能の生理作用を生じることから、健康指標として欠かせない物質の一つとなっている。

一般に、茶葉や茶飲料水中のカテキン類を分離定量するには、茶葉にはカテキン以外の夾雑物が多いため、カテキンの定量のためには、高分解能を有する分析法が必要になる。この目的に叶う方法としては、現在ではガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)[6,7]や高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS, TOF-MS)などが一般的に用いられ[8,9,13-16]、また、カテキン類の一斉分析をGC/MSで試みている例[6]もあり、高分解能を有する分析機器を利用した分離定量操作が必要となっている。一方で、

茶葉生産地の現場での品質管理や茶飲料製品の製造工程での製品管理に伴う検査などルーチン分析を対象とした場合は、指標物質を設定した上で、より簡易で迅速な計測法が要求される現状もある。

低濃度の目的成分を迅速に測定する方法として水晶振動子 (Quartz Crystal Microbalance, QCM) を用いた重みセンサ技術がある。これは QCM に加わる荷重に依存した水晶結晶間に生じる振動数変動を計測し、QCM 表面に吸着した成分量を基に濃度を知る手法である。一般に QCM による分析技術では、抗原抗体反応に基づく計測法が主流である。分析成分 (抗原) に対して特異的な分子認識能を持つ抗体を QCM 金電極面に被覆し、抗原抗体反応に基づき目的分子を QCM 上に取り込みその荷重分による振動数減少量を測定する方法である。既存の抗原抗体反応が利用できる反面、可逆的な吸脱着が容易でなく、ルーチン分析で直面する多検体連続分析やランニングコストの面で課題が残っている。

これに対して、抗原抗体反応を人工的に模倣した手法の一つにモレキュラーインプリンティング法 (MI 法) がある。抗原に相当する分析目的分子をテンプレートとして、抗体に相当するホスト分子を重合して作製する方法である。最近、これまで塊状重合体として得られていたホスト分子を薄膜として得る方法が報告された [17-19]。しかし、鋳型形成時に重合反応を伴う合成法は再現性の高い鋳型材料を得ることが困難である。著者らはナイロン 6 をホスト分子とした鋳型薄膜作製法を検討した。この中で、重合過程を伴わずにテンプレート分子の鋳型サイトを有するホスト分子薄膜を提案した [20]。この鋳型薄膜作製法は種々の既存の素材表面に容易に被覆することが可能である。

そこで本研究は、茶葉や茶飲料食品に含まれる代表的なカテキン類である (+)-カテキン分子を対象とし、その定量法について検討を行った。なお、カテキンには (+) 体と (-) 体の異性体が存在するが、通常の HPLC 分析や GC 分析では分離分析が困難で同様に本法でも識別が困難であった。そこで、(-)-体を含めて (+)-カテキンを指標分子とし、このテンプレート分子の鋳型薄膜 (Imprinted polymer, IP) を QCM の金電極面に被覆した (+)-カテキン IP-QCM センサを作製し、(+)-カテキンの検出における選択性と定量法について検討を行った。

2. 実験

2.1 試薬

鋳型薄膜試薬として、(+)-カテキンは分析用試薬 (東京化成工業)、ギ酸は特級試薬 (和光純薬工業) をそのまま用いた。ナイロン 6 (創和化学) は、平均分子量 $M_w = 10000$ 、比重 1.14 (23 °C)、 T_g 62.5 °C、融点 220 °C のペレット状のものを使用した。その他、(-)-エピカテキンと (-)-カテキン (和

光純薬工業)、カテコールとカフェイン (関東化学工業)、L-アスコルビン酸、ダイゼイン、ゲニステインおよび (-)-エピガロカテキンガレート (東京化成工業) は、市販のものをそのまま用いた。

2.2 (+)-カテキン IP-QCM センサの作製

ギ酸 30 mL に 6-ナイロン 0.05 g, (+)-カテキン 3.48×10^{-3} g を加え、25 °C、3 時間攪拌を行い完全に溶解させた。これを (+)-カテキン IP 溶液とした。

QCM には、デュアルタイプ AT カットツインセンサ (30 MHz)、直径 0.9 cm、金電極直径 0.5 cm、電極有効面積 0.088 cm^2 の NDK PSA10A (日本電波工業) を用いた。

調製した (+)-カテキン IPM 溶液をこの QCM センサの 1 チャンネル側の金電極表面にマイクロシリンジを用いて 0.6 μL 均一に塗布し、デシケーター内でギ酸を揮発させた。

2.3 (+)-カテキン IP-QCM センサ・フローインジェクションシステム

作製した (+)-カテキン IP-QCM センサをフローセル容量 50 μL の 25 °C 恒温フローセルチャンバー (PSA-CA-3002, 日本電波工業) に装着し、シリンジポンプ (KDS 100J, KD Scientific Inc.)、インジェクター (レオダイン 7725i, レオダイン)、周波数計測分解能 0.01 Hz の周波数カウンタ (NDK NAPICS 10A, 日本電波工業) からなるフローインジェクションシステムを構築した (Fig. 1)。

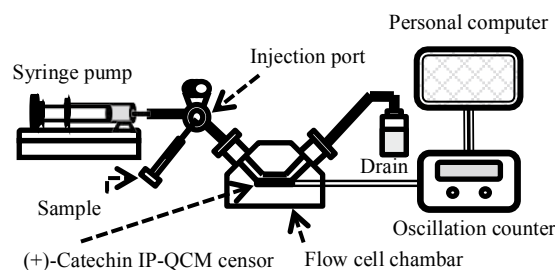


Fig. 1 Flow injection analysis system using a (+)-catechin IP-QCM sensor

キャリアーとして 10 vol% メタノール水溶液を用い、テンプレート分子である (+)-カテキンを含む IP-QCM に 0.15 mL min^{-1} で 10 分間通液して (+)-カテキンを溶出させた。その後、 $5.0 \times 10^{-2} \text{ mL min}^{-1}$ にして試料の分析を行った。なお、本分析システムには分離カラムを用いていないのが特徴である。

2.4 (+)-カテキン IP への (+)-カテキンの吸着

本研究における MI 法の形成原理の概念図を Fig. 2 に示した。ギ酸溶媒中で (+)-カテキンのヒドロキシ基とナイロン 6 のアミド基中の N や O と水素結合を形成する。その状

態で(+)-カテキン-IP 溶液を金電極面にキャストリングしてギ酸を蒸発させ、ナイロン 6 の三次元網目構造を持つポリマーを形成させると、(+)-カテキン分子がナイロン 6 で抱接される。その後、(+)-カテキンを溶出させることで(+)-カテキン分子の形状の空隙を有するインプリント薄膜が形成される。

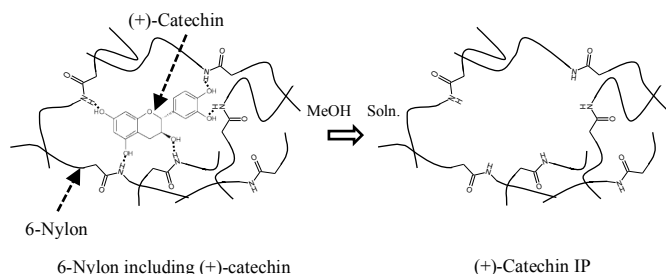


Fig. 2 6-Nylon molecule which have site of (+)-catechin molecule

3. 結果及び考察

3.1 (+)-カテキン-IP-QCM への(+)-カテキンの応答

70 mg L⁻¹ の(+)-カテキンのメタノール水溶液(10 vol%)について、(+)-カテキンの応答を測定した。(+)カテキンを分析したとき得られた周波数の経時変化を Fig. 3 に示した。

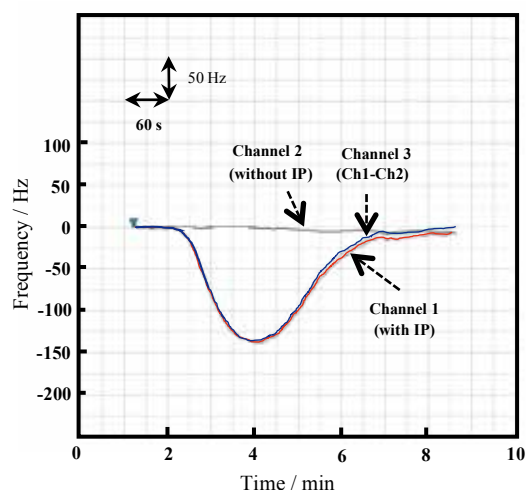


Fig. 3 Frequency response for 70 mg dm⁻³ of (+)-catechin by a (+)-catechin-QCM sensor

図中の Channel 1 は(+)-カテキン鑄型薄膜を被覆した金電極面, Channel 2 は被覆未処理の金電極面, Channel 3 は Channel 1 と Channel 2 の差分を示している。(+)カテキン試料注入後、約 1 分後より鑄型薄膜への(+)-カテキン分子の吸着に伴い、その負荷荷重による周波数の減少が生じて

いる。その後、(+)-カテキンの鑄型サイトからの溶出に伴う荷重減少により、周波数が初期状態にまで復帰することがわかった。従って、鑄型サイトより(+)-カテキンを溶出させるための付随的脱離操作を必要とせず、多検体試料を連続で分析することが可能であった。分析時間は 1 検体あたり約 6 分程度であった。

3.2 (+)-カテキン濃度と吸着量および周波数応答の関係

5~100 mg L⁻¹ の(+)-カテキンの 10 vol%メタノール水溶液について、同一の(+)-カテキン IP-QCM センサにより、分析を行い、周波数応答を計測した。キャリアーの組成、流量、温度および注入量は、それぞれ 10 vol%メタノール水溶液、5.0×10⁻² mL min⁻¹, 25 °C および 0.1 mL であった。(+)カテキン濃度と減少した周波数の関係を Fig. 4 に示した。なお QCM に吸着した(+)-カテキン量は、Sauerbrey の式 1 [21] をもとに算出した。

$$\delta m = (s \cdot (\rho \cdot \mu)^{1/2} / (2 \cdot N \cdot F^2)) \cdot (-\delta F) \quad (1)$$

δm , s , ρ , μ , N , F , δF は、それぞれ水晶振動子に吸着した吸着質量(g)、電極面積(0.088 cm²)、水晶の密度(2.65 g cm⁻³)、水晶の剪断応力(2.95×10¹¹ g cm⁻¹ s⁻²)、オーバートーン次数(1)、公称周波数(30.834 MHz)、および試料注入後の周波数の変化(Hz)である。

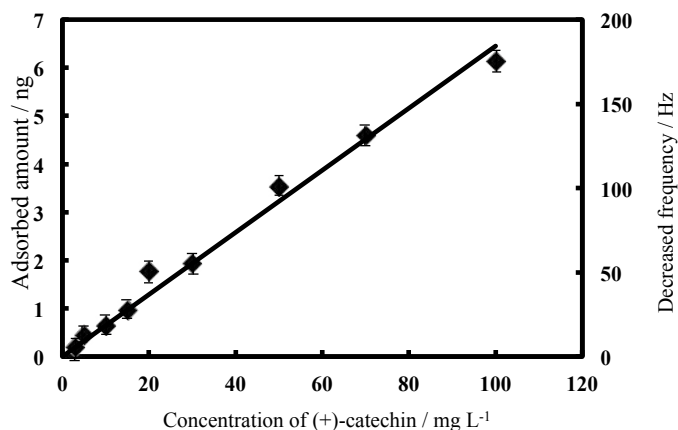


Fig. 4 Relationship between the (+)-catechin concentration, the adsorbed amount and the decreased frequency

その結果、(+)-カテキン濃度の増加に依存して、(+)-カテキン IP-QCM の周波数は減少することがわかった。検出下限濃度は、0.263 mg L⁻¹ (S/N = 3) であった。また 5 回の繰り返し測定における減少した周波数応答の平均とその変動は、(+)-カテキン濃度が 5, 50 および 100 mg L⁻¹ のとき、それぞれ 12.5, 101 および 175 Hz、それらの相対標準偏差(RSD)はそれぞれ 10.4, 3.2 および 0.5 % であった。また、IP-QCM センサは、同一のセンサで種々の濃度の(+)-カテ

キン試料を約 50 回測定しても、定量値の再現性や大きさに大きな変動は見られず、繰り返し使用できることがわかった。

3.3 (+)-カテキン IP-QCM センサの選択性

(+)-カテキン IP-QCM センサによる(+)-カテキンの検出における選択性について検討した。鑄型サイトの分子形状認識能の評価を行うため、(+)-カテキンの分子形状に類似しており、また茶飲料食品に多く含まれているカテキン類や共存物も考慮して検出選択性を比較した。ゲスト分子として、(-)-エピカテキン、(-)-エピガロカテキンガレート、カフェイン、ダイゼイン、カテコール、ゲニステイン、フェノール、L-アスコルビン酸を用いた。

本研究で作製した(+)-カテキン IP-QCM により種々のゲスト分子に対する吸着量を調べたところ、Fig. 5 の上図のようになった。

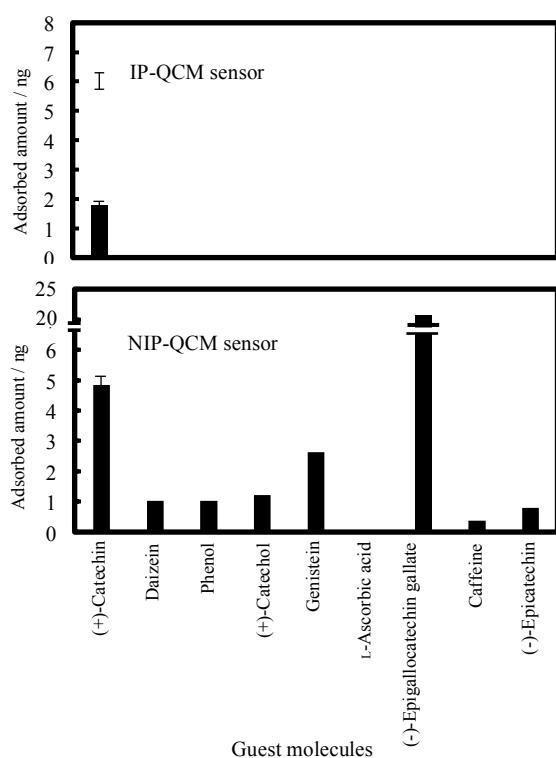


Fig. 5 Selectivity of (+)-catechin IP-QCM and NIP-QCM sensors for various guest molecules

その結果、(+)-カテキン IP-QCM において、(+)-カテキン以外のいずれのゲスト分子も応答が見られないことから、これらの共存分子に影響されずに高選択的に(+)-カテキンが測定できることが明らかとなった。特に、オキサン環へのヒドロキシ基の置換位置のみ異なる(-)-エピカテキンにおいても鑄型サイトに捕捉されないことがわかった。この結果よりヒドロキシ基が多く付加している(-)-エピガロカテキンや、大きな付加体が存在する(-)-エピガロカテキン

ガレートなどは、同様に鑄型サイトの取り込みは生じないものと思われる。それゆえ、本分析システムではカテキン類を分離するための分離カラムは必要ではない。

一方、テンプレート分子を用いず鑄型サイトを持たないナイロン 6 薄膜のみを被覆した非鑄型薄膜-QCM (NIP-QCM) を作製し、ゲスト分子の吸着挙動を調べた結果が、Fig. 5 の下図である。

その結果、特異的な選択能を有していた(+)-カテキン IP-QCM の場合と比較すると、種々のゲスト分子に対して応答が生じ、(+)-カテキンに対する選択性が著しく低下することが認められた。特に茶葉や茶飲料に多く含まれる前述の(-)-エピガロカテキンガレートの吸着量が(+)-カテキンの約 4 倍上昇した。これらの要因は、NIP-QCM のナイロン 6 薄膜表面上にフリーのアミド基が多数存在して露出していて、この部位とゲスト分子との水素結合や他の部位との疎水性相互作用により多数のゲスト分子がランダムに表面吸着し、結果的に選択性の低下に繋がったものと推測される。すなわち、ナイロン 6 表面に鑄型サイトが存在する場合、このサイト形状と異なるゲスト分子を排除して吸着阻害を生み出している結果とも言える。

3.4 緑茶中の(+)-カテキンの定量

緑茶を対象に、本法の(+)-カテキン IP-QCM センサによる定量値と HPLC 分析による定量値を比較した。

3.4.1 緑茶試料の前処理

始めに本法による分析法および HPLC 分析を行う前に緑茶中の不溶性物質などを除去するため、緑茶試料水の前処理について検討した。純水、MeOH、純水の順で C18 カートリッジ (InertSep SlimJ C18, ジーエルサイエンス) を洗浄し、続いて、(+)-カテキンを含む緑茶試料 0.5 mL を通した。その後、MeOH 水溶液の濃度を変えて(+)-カテキンを溶出

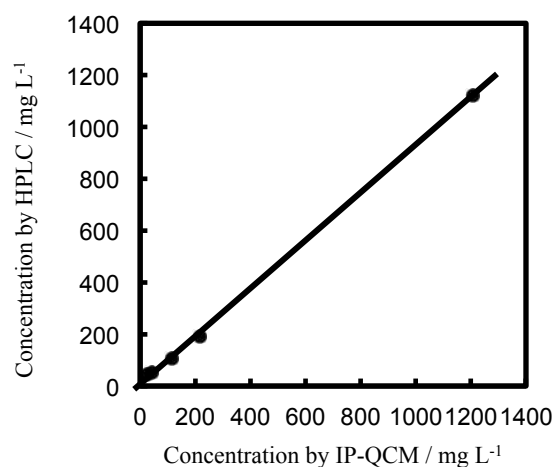


Fig. 6 Relationship between (+)-catechin concentration by IP-QCM and that by HPLC

させ、回収率を測定した。その結果、MeOH 濃度が 35 vol% 以上で C18 カートリッジより (+)-カテキンが損失無く回収できることがわかった。

3.4.2 (+)-カテキン IP-QCM センサと HPLC 分析との定量値の相関

緑茶飲料水中の (+)-カテキンの定量値の正確さを確認するため、(+)-カテキン IP-QCM センサ及び HPLC を用いて同一試料を分析した。この時の IP-QCM センサによる分析条件は、2.2 項および 2.3 項と同様である。一方、HPLC の分析条件は次の通りである。LC ポンプは、LC-20AT(島津製作所)、検出器は紫外可視吸光検出器 SPD-20A(島津製作所)、波長 λ 286 nm、分離カラムは ODS カラム(C₁₈) (i.d.) 4.6 mm×15 cm) を使い、キャリヤーは 10 vol% MeOH、流量 1 mL min⁻¹、カラム温度 25 °C とした。

市販の緑茶飲料水 5 種について、本法と HPLC 分析により (+)-カテキンの定量を行った結果を Fig. 6 に示した。

両者の関係は、 $C_{\text{HPLC}} = 1.07 C_{\text{QCM}}$ となり、(+)-カテキン濃度の定量値は良く一致していることが明らかとなった。なお、この結果より、茶試料に共存する (-)-エピカテキン、(-)- エピガロカテキン、(-)- エピカテキンガレート、(-)- エピガロカテキンガレート及びそれらのエピマー体は、(+)-カテキンの定量に妨害を与えていないことがわかった。

3.4.3 緑茶飲料中の (+)-カテキンの定量

市販の緑茶飲料水について、(+)-カテキン IP-QCM センサを用いて (+)-カテキン濃度の測定を行った。緑茶飲料水 10 種について分析した結果を Table 1 に示した。

市販緑茶飲料中の (+)-カテキン濃度は、酒石酸-吸光光度分析法による測定では 200~950 mg L⁻¹ と報告[22-24] されている。本研究で得られた 25.7~1124 mg L⁻¹ の分析値は、概ね報告値と同程度のオーダーにあり、妥当と考えられる。

Table 1 Concentration of (+)-catechin in commercial green tea drinks

Commercial green tea drinks	Concentration / mg L ⁻¹
A	193
B	137
C	100
D	60.1
E	56.2
F	25.7
G	39.8
H	54.0
I	105
J	1124

4. 結論

(+)-カテキン IP-QCM センサによる高選択的で簡易迅速なセンシングシステムについて検討した。ナイロン 6 をホスト分子として (+)-カテキン分子の鑄型を有する薄膜を QCM の金電極面に被覆した QCM センサを作製したところ、(+)-カテキンゲスト分子に対して高選択的な検出が可能であった。さらにこの QCM センサを用いた流れ分析法は、流れ系において反応試薬を必要としないシンプルな測定系が構築でき、かつ多検体連続分析も可能であった。また、応用分析として市販の茶飲料中の (+)-カテキン濃度を簡易に測定でき、その定量値は既存の HPLC 分析法による定量値と高い相関が得られた。

本法は、定量したい目的分子をテンプレートとした鑄型薄膜を容易に調製でき、これを QCM に被覆した QCM センサを作製することで、測定対象の広い分析手法になり得るものと考えられ、さらなる発展的な展開が期待できる。

5. 文献

- [1] 広瀬真一, 玉田重吉, 茶業研究, 第 50 号, 51(1979).
- [2] 松井輝明, 荒川康行, 月刊医学と薬学 **55**(3), 339 (2006).
- [3] 中山勉, 日本獣生大研報 **62**, 1 (2013).
- [4] B. Cornelia, L. Michael R., C. Veronica S., I. Alexandru, *Food Chem.* **141**(3), 3282 (2013).
- [5] 西條了康, 加藤みゆき, 茶研報 **107**, 1 (2009).
- [6] 倉田正治, 櫻井隆郎, *BUNSEKI KAGAKU* **61**, 63 (2012).
- [7] L-Z.Lin, P.Chen, J.M.Harnly, *J. Agric. Food, Chem.* **56**, 8130 (2008).
- [8] T.Tanaka, I. Kouno, *Food Sci. Technol. Res.* **9**, 128 (2003).
- [9] Y.Chen, J.Duran, S.Yang, E.Yang, Y.Jiang, *Plant Foods Hum. Nutr.* **64**, 293 (2009).
- [10] 末松伸一, 久延義弘, 西郷英昭, 松田良子, 小松美博, *食科工* **42**, 419 (1995).
- [11] 衣笠仁, 竹尾忠一, 矢野信礼, *食科工* **44**, 112 (1997).
- [12] 西条了康, 武田善行, *NIPpon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **46**(3), 138 (1999).
- [13] 梶本五郎, 村上智嘉子, *日本栄養食糧学会誌* **52**, 209 (1999).
- [14] 谷口抄子, 黒田佳代, 土居功一, 稲田和敏, 吉門直美, 米田裕治, 田部昌弘, 柴田高, 吉田隆志, 波多野力, *YAKUGAKU ZASSHI* **127**, 1291 (2007).
- [15] R.A.Wulandari, N.Haraguchi, H.Nakamura, Y.Furukawa, T.Tanaka, I.Kouno, D.Kawamura, K.Ishimaru, *J. Food Safety* **18**, 116 (2011).
- [16] M.Suzuki, R.Nakabayashi, T.Mori, K.Saito, K.Shiratake, *Plant Biotechnology* **32**, 267 (2015).

- [17] T.Kobayashi, H. Y. Wang, Y. Fukaya, N. Fujii, *ACS Symp. Ser.* **703**, 188 (1998).
- [18] 松本洋昭, 深澤聡, 椎木弘, 長岡勉, *Chem. Sens.* **23A**, 52 (2007).
- [19] 市川貴生, 三好利昌, 加藤田一平, 斎藤貴: *材料の科学と工学* **40**, 22 (2003).
- [20] 斎藤貴: *材料の科学と工学* **46**, 29 (2009).
- [21] G.Sauerbrey, *Zeitschrift für Physik* **155**, 206 (1959).
- [22] 町田大輔, 高橋雅子, 永井由美子, 佐藤有記, 堀口恵子, 高村一知, *明和学園短期大学紀要*, 第 **23** 集, 117 (2013).
- [23] 大森正司, *日本食品化学工学会誌* **45**, 385(1998).
- [24] 高橋雅子, 佐藤有紀, 川村菜那実, 高橋明音, 永井由美子, 堀口恵子, 高村一知, *明和学園短期大学紀要*, 第 **24** 集, 137 (2014).

(Received September 3, 2018)

(Accepted December 7, 2018)