

表面プラズモン共鳴現象を利用した 栄養素分析が可能なセンサーシステムの開発

満塩 勝

鹿児島大学 学術研究院 理工学域 工学系

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-40

Tel: 099-285-8342

要旨

近年、機能性食品についての関心が高まっており、これに合わせて食品表示法の改正により、これまでよりも厳密な栄養素分析が必要になってきている。しかし、現在の分析法はほとんどすべてバッチ式による統計的な手法であり、連続的な全量分析は行われていない。本申請課題では、ポリフェノールの検出法の基礎的知見を得るため、連続分析を得意とする金蒸着ガラス棒 SPR センサーを用い、カテキンを代表物質としてその検出を試みた。

単純な屈折率による SPR 測定では、お茶などの飲料に含まれている程度のカテキンの高精度の検出はきわめて難しいことが分かった。そこでカテキンが還元性を有していることを利用して、金表面で還元反応により銀ナノ粒子を発生させ、金の SPR 現象に干渉させる方法を考案した。その結果、検出感度を大幅に向上させることができ、栄養素の分析のための新たな知見を得ることができた。しかし、金表面上に生成した銀ナノ粒子の除去など、実用化にはもう一段階研究を進める必要があることも明らかになった。

1. 緒言

コロナウィルスの影響により日本人の健康と食事に対する考え方に大きな変化が見受けられ、中でも機能性食品の需要は今後急速に高まると予想される。2018年の段階ですでに増加傾向になると予測されていた保健機能食品の需要¹⁾は、ウィズコロナ・アフターコロナの時代に入ると、経済の立て直し政策と合わさってこの予想を上回る需要が発生することが考えられる。しかし、この消費促進の流れに対して足かせとなり得るのが、2020年4月1日より施行され表示規定が厳格になった新しい食品表示法である。これまで任意表示であったエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸などの一部の栄養素の表示が義務化されるなど、これまで以上に厳重な成分分析が必要となり、保健機能食品の保証には繋がるが生産コスト増加に影響する。

これに対して、現在の栄養成分の分析にはバッチ式の化学的および分光学的手法が用いられており、測定における高い分析精度を誇るが連続的な全量分析は苦手である。そのため、食品表示法に則った精度で栄養素の成分分析を行うためには統計的な抜き取り調査が必要であり、多くのサンプル数で調査を行う必要があるため、この測定にかかるコストの上昇の影響は製品の単価にも影響しうる。したがって、栄養成分の安価、迅速かつ正確な分析が可能なシステムが求められている。

多くの栄養素の中で、ポリフェノールはフェノール性の水酸基を複数持つ化合物の総称であり、その数は8,000を超えるとも言われ、多くの穀物やイモ類、豆類、野菜類、種実類など、植物由来の食品に多く含まれており、苦味や渋味、色素の成分の一つである²⁾。また、抗酸化作用を有し、体内の活性酸素を取り除いて人体の酸化を防ぐ効果があると言われ、がんや循環器疾患、認知症などの生活習慣病の予防や免疫機能の低下を抑える効果があると報告されている³⁾⁴⁾。

日本人のポリフェノール摂取の傾向として、565名に対する調査から緑茶からの摂取が30%以上を占めている⁵⁾⁶⁾。また、ポリフェノールには、化学構造の違いによって様々な種類があるが、緑茶に含まれるポリフェノールの約8割がカテキンであり、温度や種類により抽出される量が大きく異なることも分かっている⁷⁾。一般的にはポリフェノールはたくさんの方が良いと考えられており、書籍やネットの情報のほとんどは沢山摂取すべきと説明しているが、その一方で、特に妊娠後期に過剰に摂取すると赤ちゃんの血管の一部が狭まったり閉鎖したりする動脈管早期収縮を引き起こす可能性が指摘されはじめている。胎児期にこれが起こると心不全や新生児仮死の原因になることがあるため、盲目的な摂取に警鐘を鳴らす医師もいるため、正しく濃度を測定する必要性が高まっている⁸⁾。

金属薄膜層を形成した高屈折率媒体の内表面から光の全反射角度以上の入射角で光を入射すると、金属薄膜と接触している物質の屈折率に応じた入射角や波長の光が吸収される表面プラズモン共鳴(SPR)現象が誘起される。この現象を利用することにより非破壊で迅速かつ簡便に試料の屈折率や濃度を検知するセンサーシステムを構築することができる。

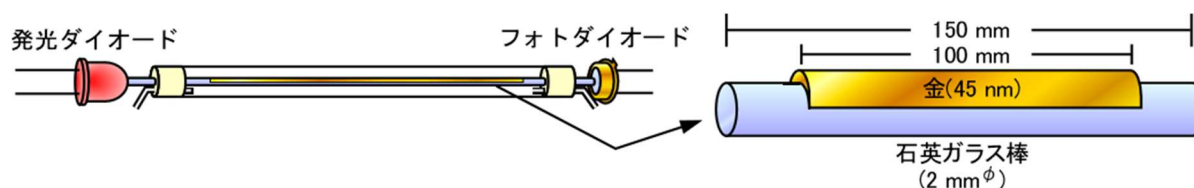


Fig. 1 Schematic representation of the gold-deposited glass rod SPR sensor

本研究では、Fig. 1 に示すように市販の SPR センサーに使用されているプリズムの代わりに安価で強靱な石英棒を用い、その側面に金薄膜層を形成して石英棒を透過してくる光の強度を測定することで、金薄膜と接触している試料の屈折率に対応して石英ガラス棒を透過する光の強度が変化することを見だし、これを用いたセンサーシステムの開発を行ってきた。これは金蒸着ガラス棒 SPR センサーシステムと呼ばれ、数万円程度でシステムを構築することができ、市販の屈折率計と同等の性能を誇っている。この金の表面に選択膜層を構築することにより、特定の物質を計測することができる。

本申請課題は、栄養素分析センサーの基礎を構築するためにポリフェノール的一种であるカテキンを高感度で検出するための手法を開発することを目的としたものであり、食品の栄養素分析に利用可能で小型で安価かつ単純な構造でメンテナンスフリーなセンサーシステムを開発するための基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 実験

金属表面近傍に存在する自由電子は、金属と接触している媒体の誘電率(屈折率の二乗)の影響を受け、特定の条件下で反射光の一部を減衰させる現象を引き起こす。厚さ数十 nm の金薄膜層をプリズムのような高屈折率媒体上に形成し、プリズムの内表面から全反射角以上で光(波長 λ)を入射すると、金薄膜と接触している試料の屈折率(n_s)に対応した入射角の光が消失する。これを利用したものが SPR センサーであり、消失する反射光の角度を測定することによって、試料の屈折率を知ることができる。

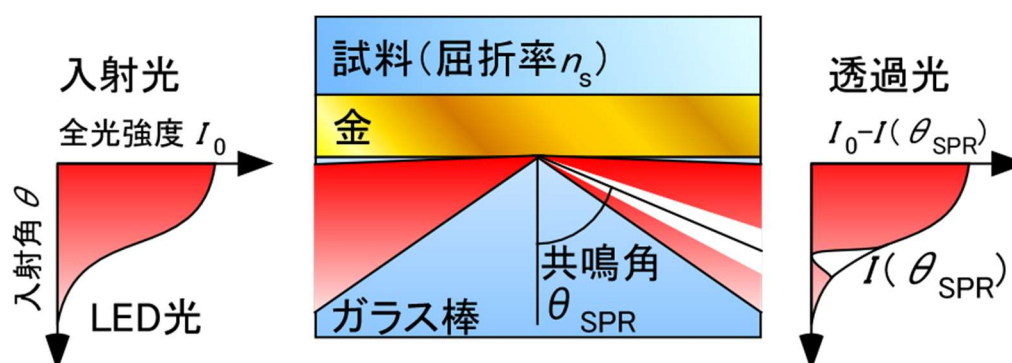


Fig. 2 Cross-sectional image of a sensor and a light path

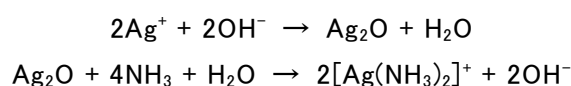
本研究で用いているセンサーは、Fig. 2 に示したようにその断面は従来の SPR センサーと類似している。ガラス棒の端面に直接発光ダイオードを接触させて全光強度 I_0 の光を入射させると、金薄膜層がない場合はガラス棒/試料界面で全反射が起こるのみであるが、Fig. 2 のようにガラス棒と試料の間に金薄膜層が存在すると、SPR の共鳴角 θ_{SPR} において光の共鳴が起こり、入射光の一部の強度 $I(\theta_{\text{SPR}})$ が吸収されて透過光が減衰する。入射光の強度には入射角 θ と相関があるため、フォトダイオードによって透過光の強度 $I_0 - I(\theta_{\text{SPR}})$ を測定することによって物質の屈折率の測定が可能である。

3. 結果と考察

本申請課題では、数多くの栄養素の中からポリフェノールに着目し、特に日本人が多く摂取しているカテキンを代表試薬として用いた。先行研究としては、ポリフェノールの還元作用を利用して銀イオン溶液から銀ナノ粒子を生成させ、その生成量を吸光光度計で測定するというものがある⁹⁾。この方法の場合は食品に銀イオン溶液を加えることになるため、食品の全量検査に応用することは不可能である。しかし、ポリフェノール検出のための数少ない有力な手法であるため、この還元反応を利用する方法を採用した。

3. 1 カテキンによる銀錯体溶液の還元による銀ナノ粒子の発生の確認

基礎実験として、文献⁹⁾に従って銀ナノ粒子の生成条件の確認を行った。はじめに、5 mmol/L 硝酸銀水溶液 100 mL に水酸化ナトリウム 20 mmol を加えて酸化銀(I)の沈殿を生成した。次に、3 mmol/L のアンモニア 150 μL を加えると、沈殿が消失して溶液が透明に変化した。これは、硝酸銀を水に溶解させることによって生じた銀イオンがアルカリ性条件下で酸化銀に変化して沈殿し、アンモニアを加えることによってジアンミン銀(I)イオンに変化して再溶解するためである。この化学反応は銀鏡反応の前準備などでよく知られており、以下の反応式で表される。



次に、この溶液と 0.5 mmol/L (約 15 mg/100 mL) のカテキンを等量混合して反応させた。混合させた直後は薄い褐色だったものが時間経過に伴って濃い褐色となった。粒径 100 nm 程度の大きさの銀ナノ粒子は 550 nm 付近に表面プラズモンに起因する吸収帯を持っている。そこで、赤(650 nm)と緑(532 nm)のレーザーポインタの光を入射させ、その浸透長さを見ることで銀ナノ粒子の生成の簡易的な確認を行った。溶液混合直後からビーカー内に見える緑のレーザーポインタが短くなり始め、6 分程度でその変化が止まったことから、溶液内に銀ナノ粒子が生成したことと、その粒径は 100 nm 前後であることが予想された。

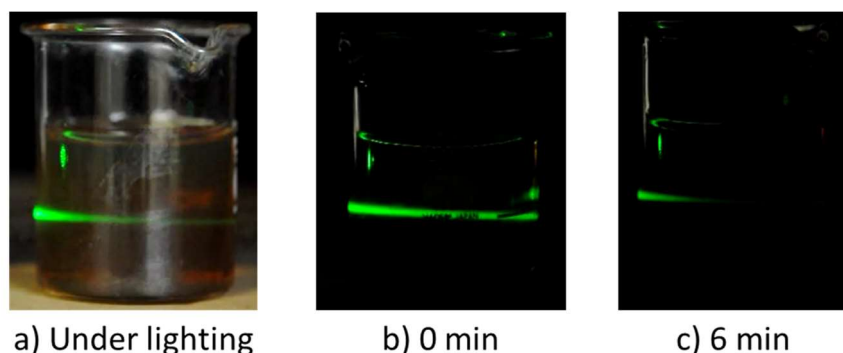
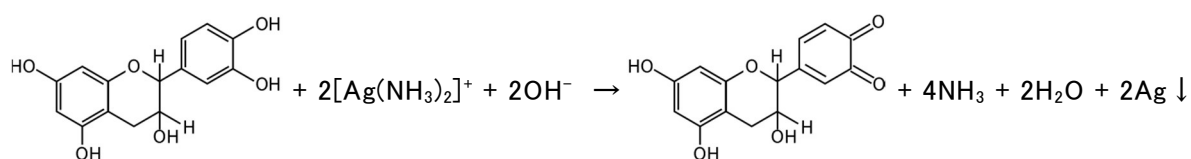


Fig. 3 Generation of silver nanoparticles from diammine silver (I) ions solution with the addition of catechin

ポリフェノールに共通するフェノール性の水酸基は還元性を持っており、これが金属イオンを還元してナノ粒子を生成することが予想される。しかし、ポリフェノールは数が多いため個々の反応式について詳細に論じられている論文はきわめて少なく、具体的にどのような化学反応を経て金属ナノ粒子が生成されるのかを明記しているものはほとんどない。

カテキンは、酸化剤と共存したときに化学構造の末端にある二つのフェノール性水酸基が酸化されてアルデヒド基になることが報告されている¹⁰⁾。この性質から、この現象において以下の化学反応が起こっていると推測された。



北海道消費者生活センターの報告によると、一般的にお茶に含まれるカテキンの含有量は、一般的に販売されている緑茶 13 銘柄に対する調査で平均が 53 mg/100 mL、最小と最大がそれぞれ 32 と 164 mg/100 mL と報告されている¹¹⁾。この反応では飲料用のお茶の最小値の約半分である 15 mg/100 mL のカテキン濃度でも緑の光の吸収が目視できるほどの銀ナノ粒子の生成が観測されていることから、この方法によるカテキンの検出は十分に可能であることが分かった。

3. 2 金表面による銀ナノ粒子の発生を利用したカテキンの検出

はじめに、45 nm の金薄膜層を形成したガラス棒センサーで直接カテキンを検出することを試みた。カテキン水溶液の濃度は前述と同じ 0.05 mmol/L (15 mg/100 mL)であり、SPR センサーが応答する物理量である屈折率は、蒸留水が 1.3325 に対して、カテキン水溶液が 1.3326 であった。Fig. 4 に測定の結果を示す。

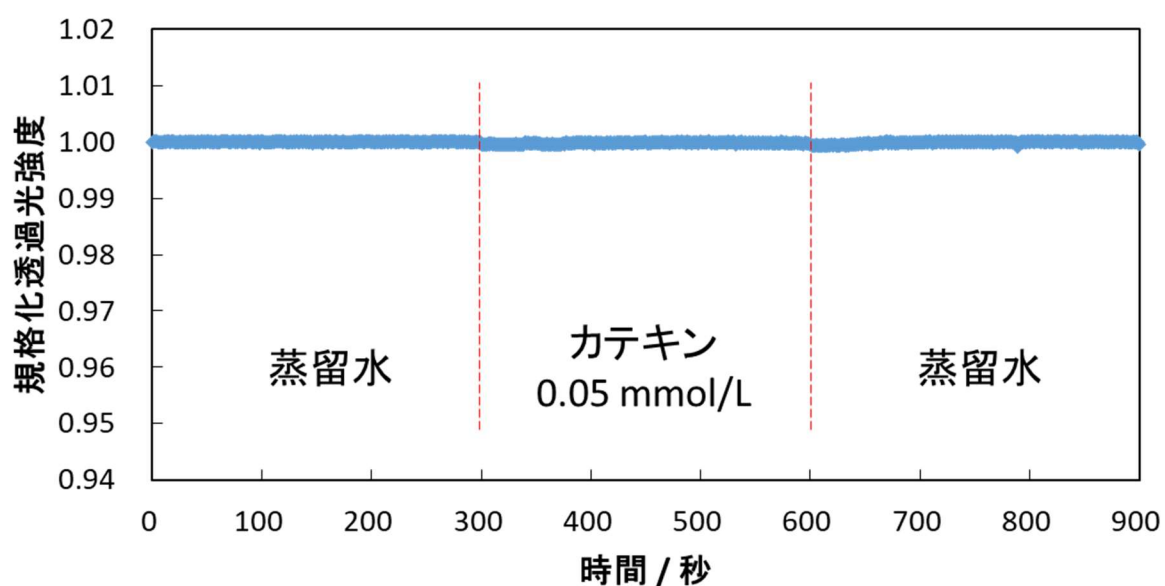


Fig. 4 Direct measurement of the catechin aqueous solution

1×10^{-4} の屈折率変化はセンサーの検出限界以上であり、蒸留水からカテキンに変えた直後にわずかに透過光強度のずれが見られることから多少は応答していると考えられる。しかし、水の温度が 1°C 温度変わると屈折率の 10^{-4} の桁に影響が現れるため、温度の影響による変動も大きく、効果的に測定できているとはいい難かった。

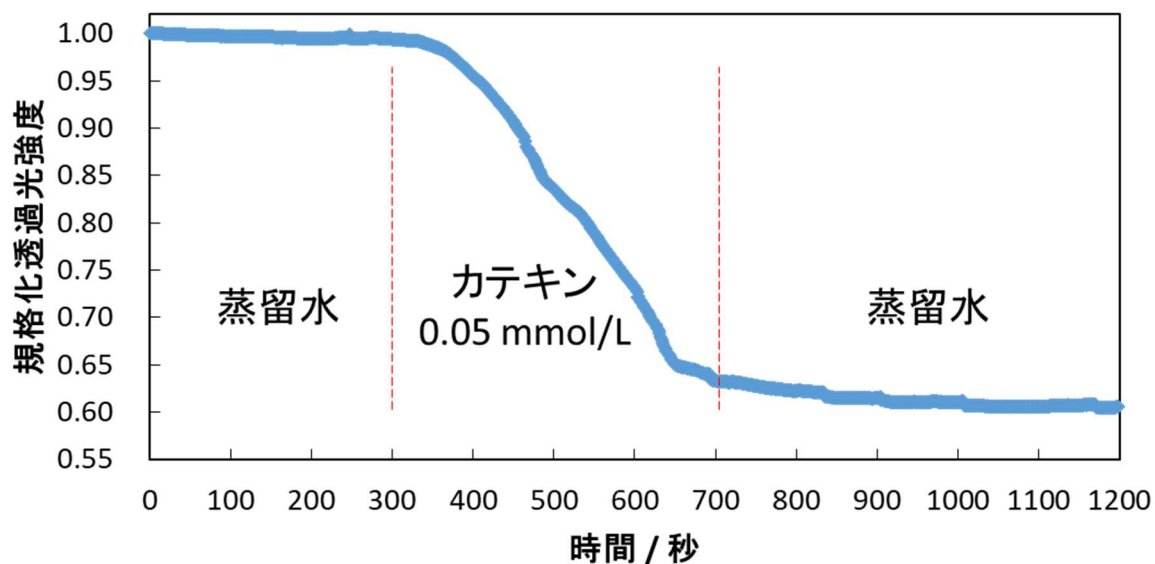


Fig. 5 Detection of the catechin using silver nanoparticle generation

これに対し、Fig. 5 に金表面でカテキンによる銀ナノ粒子の生成を行なわせた場合の応答を示す。単純な屈折率変化を検出した場合、応答にはほとんど変化が見られなかったが、銀ナノ粒子の生成を利用すると、応答に非常に大きな変化が生じた。これは銀ナノ粒子も SPR 現象を誘起するため、金の SPR 現象に強く干渉して応答が大きく変化したためであると考えられる。しかし、カテキン測定後に水の測定を行っても応答が元に戻らないことから、銀ナノ粒子が金薄膜上に残留していることが考えられ、これを用いた濃度分析には、応答を時間で微分してその変化量から見積もるなどの数学的処理が必要であることが分かった。

本申請課題で発見した方法は SPR センサーの性能を劇的に向上させることも可能であると期待できる。しかし、金薄膜上に生成していると考えられる銀ナノ粒子の除去法についても検討を行う必要があるが、先行研究がほとんどないため、さらに研究を重ねていく必要がある。

4. 結論

カテキンが還元性を持つ水酸基を持っていることを利用して、金薄膜表面で銀ナノ粒子を生成させることにより、通常ではほとんど検出できない微量のカテキンの検出を行うことに成功した。この方法はこれまで報告例がなく、きわめて高感度であるが不可逆性のため、濃度を測定するためには微分などの数学的処理を行う必要があるなどのさらなる研究が必要であることが分かった。しかし、本研究成果は今後の食品分析において新しい方法を提案しうるものであり、大きな波及効果が期待できる。

5. 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、研究助成を頂いた公益財団法人サンケイ科学振興財団に心から感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) 三井住友銀行, 経済・業界動向に関するレポート, <https://www.smbc.co.jp/hojin/report/investigationlecture/>, 2022 年 3 月 14 日
- 2) LINK@TOYO,『ポリフェノール』とは? 医学博士に聞く、体にもたらす効果と正しい摂取方法, <https://www.toyo.ac.jp/link-toyo/life/polyphenol/>, 最終アクセス 2022 年 3 月 14 日
- 3) X. Han, T. Shen, and H. Lou, *Int. J. Mol. Sci.*, **8**, 950 (2007).
- 4) 農研機構食品研究部門, 機能性成分含有量データ (抜粋), <https://www.naro.go.jp/laboratory/nfri/contents/ffdb/ffdb.html>, 最終アクセス 2022 年 3 月 14 日
- 5) 国立研究開発法人 国立がん研究センター がん対策研究所 予防関連プロジェクト, 多目的コホート研究 (JPHC 研究), <https://epi.ncc.go.jp/jphc/outcome/8694.html>, 最終アクセス 2022 年 3 月 14 日

- 6) N. Mori, N. Sawada, J. Ishihara, A. Kotemori, R. Takachi, U. Murai, M. Kobori, and S. Tsugane, *J. Nutr. Sci.*, **10**, e35 (2021).
- 7) 中川 沙織, 星 尚寛, 久保 敦史, 大和 進, 分析化学, **62**, 51 (2013).
- 8) 妊娠・出産・マタニティ情報サイト, 【医師監修】新事実! 妊娠中はルイボスティーに注意! 赤ちゃんに与える影響は? <https://ninps.com/knowledge/food/archives/27>, 最終アクセス 2022 年 3 月 14 日
- 9) Z. Wang, Q. Wang, C. Liu, F. He, Z. Song, Q. Qiu, J. Yan, and W. Zhu, *Vib. Spectrosc.*, **107**, 103037 (2020).
- 10) 澤井 祐典, 野菜茶業研究所研究報告, **6**, 23 (2007).
- 11) 北海道消費者生活センター 商品テスト, 緑茶のカテキン類含有量, 2020 年 11 月, <http://www.do-syouhi-c.jp/test/kira124ryokutyannokatekin.pdf>, 最終アクセス 2022 年 3 月 14 日

Development of a sensing element for measurement of nutrient concentration

Masaru Mitsushio

Research Field in Engineering, Science and Engineering Area,
Kagoshima University,
1-21-40, Korimoto, Kagoshima, 890-0065
Tel 099-285-8342

Abstract

In recent years, there has been increasing interest in functional foods. This can be expected to stimulate the flow of the economy. However, the revision of the Food Labeling Law has made it necessary to perform more rigorous nutrient analysis than before. In the current food analysis, statistical sampling analysis is the mainstream and continuous analysis is not performed.

Surface plasmon resonance (SPR) is an optical phenomenon where incident light excites charge density waves at an interface between a metal and a dielectric. An SPR sensor allows us to perform non-destructive and continuous analysis. The aim of this study is to develop a new method for a detection of polyphenols using SPR phenomenon.

In this study, catechin was chosen as a representative substance of the polyphenols. A gold-deposited glass rod SPR sensor system was used for sensing system.

It was found that it is extremely difficult to detect the catechin contained in beverages such as tea with high sensitivity by the gold-deposited glass rod SPR sensor system using a simple refractive index. This is because the refractive index of chitosan contained in the beverage is very small. Therefore, taking advantage of the reducing property of catechin, a method to generate silver nanoparticles by a reducing reaction on the gold surface was developed for this study.

As a result of this improvement, the detection sensitivity was significantly enhanced. However, it has also become clear that further research is needed for practical use, such as the removal of silver nanoparticles formed on the gold surface.