

機関番号：32663

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580144

研究課題名（和文） 抗酸化活性測定システムの開発とその高感度化

研究課題名（英文） Development of reagentless sensing system for the determination of antioxidative activity using micro-distance between the electrodes

研究代表者

大熊 廣一（OKUMA HIROKAZU）

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：30297733

研究成果の概要（和文）：本研究は、電気化学的手法によりスクリーン印刷で作製したカーボンインク電極上に活性酸素（ $O_2^-$ ）を発生させ、不均化反応によって変換された過酸化水素を 500  $\mu m$  オーダーの微小距離に対向する同様の電極で高効率に検出する方法を利用して、現場レベルでの抗酸化活性測定を可能にするディスプレイ型の「抗酸化活性測定システムの開発とその高感度化」である。この方法は、酵素や特別な試薬を用いない簡便迅速な抗酸化活性測定方法である。これは、 $\mu m$  オーダーの微小距離に一組の電極を配置し、一方の電極上で電気化学的に  $O_2^-$  を発生させる。発生した  $O_2^-$  は不均化反応により過酸化水素を生成し、拡散によって微小距離にある他方の電極上に到達し、酸化されて応答電流が発生する。ここに抗酸化物質が存在すると、 $O_2^-$  を捕捉し、 $O_2^-$  の定常的拡散が抑制され、不均化反応によって発生する過酸化水素量が減少する。この減少する過酸化水素量を検出することにより、その物質が有する抗酸化活性を測定する。

本研究では、この測定システムを構築して、特性評価・最適条件の検討を行なった。また、カテキン標準液、緑茶、紅茶、ワインあるいは各種野菜の抗酸化活性を測定し、従来法である DPPH 法と比較検討した結果、両者に良好な相関関係が認められた。本システムが酵素や特別な試薬を用いない簡便迅速な抗酸化活性測定法として有望であり、この結果は、これまで分光光度計、ESR、CL-HPLC など高額な測定機器を駆使して、実験室レベルで行ってきた分析が現場レベルで実現できることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Antioxidative activity is an important factor in the development of high-functional food products utilizing such characteristic of foods, and measurement of the activity is significant. This study was performed aiming at development of an antioxidative activity measurement method using no enzyme or specific reagent. When a voltage of 0.33 V is applied to an electrode such as platinum in aqueous solution,  $O_2^-$  is generated on the electrode, and the generated  $O_2^-$  produces  $H_2O_2$  by disproportionation reaction. In this study, using this principle, a negative voltage was applied to the electrode to generate  $O_2^-$ , and  $H_2O_2$  was produced by disproportionation reaction. When an antioxidative substance is present, the substance captures  $O_2^-$  and decreases the production of  $H_2O_2$  by disproportionation reaction. Detection of the amount of  $H_2O_2$  using a proximal electrode allows investigation of antioxidative activity of substances and measurement of the activity.

To effectively detect  $H_2O_2$  produced by disproportionation reaction of  $O_2^-$ , a screen-printed carbon ink electrode (W1) for measurement of  $H_2O_2$  was placed on the opposite side of the screen-printed carbon ink electrode (W2) for generation of  $O_2^-$ . For the counter and reference electrodes, screen-printed carbon ink and silver-silver chloride ink electrode were used, respectively. To generate  $O_2^-$ , 0.9 V was applied to the W2 electrode in KCl.

To the W1 electrode, 1.1 V was applied to confirm the sensor response of this electrode. The distance between the electrodes was set to 240  $\mu\text{m}$ .  $\text{O}_2^-$ -scavenging activity of catechin standard sample solutions, tea and vegetables were measured employing this system.

The results for teas and vegetables correlated satisfactorily with those obtained DPPH method. These results suggest that the proposed system provides a simple and rapid method for the determination of antioxidative activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：抗酸化活性、抗酸化能、活性酸素、スクリーン印刷電極

1. 研究開始当初の背景

現在、食生活の欧米化に伴うカロリーの摂取過剰や栄養バランスの偏り等による生活習慣病の増加、また急速な高齢化や医療費の増大などから、「治療」よりも「予防」、特に日々の食生活における「食品因子」による健康の維持・増強や老化防止、また疾病の予防が重要な課題となってきた。なかでも注目されているものに「活性酸素」がある。この活性酸素は体内に侵入してきた病原菌やウィルスを殺す白血球やマクロファージに必要であり、また、体に必要なホルモンを合成する際にも重要な役割を果たしている。体が若く健康であるときには、役割を果たした活性酸素は無毒化され元の酸素と水に分解される。しかし、呼吸やストレスなどで体の中のある部分に異常に活性酸素が生成されるような状況下になった時、過剰に発生した活性酸素はコントロールを失い、生体成分、例えば脂質やタンパク質、酵素、核酸などを酸化させ、生体膜や組織を損傷し、動脈硬化やガン、老化等を引き起こす原因となる。

一方、これに対し、活性酸素を捕捉・消去する能力を持つ抗酸化性物質を用いて、生体の酸化防御能を強化し、活性酸素が関与する疾病のリスクを低下させるため、お茶を始め、赤ワインやココアなど特に植物が有する抗酸化機能が注目されている。特に、ポリフェノールなど活性酸素消去作用を有する成分が注目されている。最近では、植物性の食品素材のみならず、動物性タンパク質由来の $\text{O}_2^-$ 消去活性を求める研究等も進められており、高い抗酸化活性を有する食品素材の開発が

進展して行くことが予想される。このような食品の特性を活かし、食品に新しい機能を付与した高機能食品の開発においては、抗酸化活性は重要な因子である。これまで食品の抗酸化活性を評価する方法として、種々の測定方法が用いられているが、一般的な測定方法は、安定な有色ラジカルである DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) の消去活性を計測する方法である。この方法は多検体分析に威力を発揮するため、よく利用されている。しかし DPPH は自然に退色していく為、反応時間を厳密に守る必要があり、また保存がきかず、測定毎に試薬の調製を行う必要がある。一方、キサンチン/キサンチンオキシダーゼ法では、 $\text{O}_2^-$ を酵素作用で発生させて、この消去活性を ESR で直接測定するか、ルシフェリン誘導体を加えて化学発光を計測する方法が行われている。また、2価鉄イオンと過酸化水素を用いてヒドロキシラジカルを発生させ、リポソーム中の過酸化脂質増加を TBA 法で測定する方法、基質としてリポソームのほか、ヒト血液から分離した低密度リポタンパク質 (LDL) を用いる方法、リノール酸を空気中で自動酸化させて共存させた  $\alpha$ -カロテンの退色を測定する方法、リノール酸とチオシアン鉄を用いる方法 (ロダン鉄法) がある。また、蛍光試薬を用いてヒドロペルオキシドを定量する HPLC の高感度測定法が開発されている。いずれの方法も測定に特殊な試薬と高額な計測機器 (ESR、蛍光検出器あるいは HPLC) を使用し、測定手順が煩雑で測定が常に実験室に限られるなど汎用性に問題がある。

一方、「食品因子」による生活習慣病予防の観点から、食品素材の抗酸化機能や加工時における抗酸化機能の消長など、広範囲なデータを収集し、解析する必要がある。このため、短時間で簡便な抗酸化活性（特に活性酸素消去活性）測定方法の開発が急務である。

## 2. 研究の目的

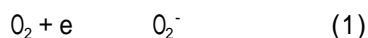
本研究は、電気化学的手法によりスクリーン印刷電極上に活性酸素 ( $O_2^-$ ) を発生させ、不均化反応によって変換された過酸化水素を  $\mu m$  オーダーの微小距離に対向する電極で高効率に検出する方法を利用して、現場レベルでの抗酸化活性測定を可能にする「抗酸化活性測定システムの開発とその高感度化」である。

この方法は、酵素や特別な試薬を用いない簡便迅速な抗酸化活性測定方法である。この新規システムの対向スクリーン印刷電極を含む検出部は使い捨てで、測定部は電気回路のみとなることから小型化が容易となる。そこで本研究では、(1)スクリーン印刷による抗酸化活性測定用カーボンインク電極の特性評価および測定システムの最適化、(2)電気化学的手法による活性酸素発生、(3)標準抗酸化性物質（カテキン類）による測定システム評価、(4)食品の抗酸化活性測定と従来法との比較検討を行なった。

## 3. 研究の方法

### (1)カーボンインク電極の特性評価および測定システムの最適化

ポリエチレンテレフタレート（PET）フィルム（厚み  $125 \mu m$ ）上にスクリーン印刷技術により作用極と対極にカーボンインク、参照電極として銀/塩化銀インクを印刷して電極を作製した。この3電極以外はレジストを塗布して絶縁する。この電極を  $\mu m$  オーダーの微小距離に対向して配置し、一方の電極上で負の電圧（ $-0.9V$  vs.  $Ag/AgCl$ ）を印加して電気化学的に  $O_2^-$  を発生させる（1式）。発生した  $O_2^-$  は不均化反応により過酸化水素を生成（2式）し、拡散によって微小距離にある他方の電極（ $+1.1V$  vs.  $Ag/AgCl$ ）上に到達し、酸化されて応答電流が発生する。ここに抗酸化性物質が存在すると、 $O_2^-$  を捕捉し、 $O_2^-$  の定常的拡散が抑制され、不均化反応によって発生する過酸化水素量が減少する。この減少する過酸化水素量を検出することで、その抗酸化性物質が有する抗酸化能を測定した（3式）。



消去

抗酸化性物質                      定常的拡散の抑制

（電極応答出力低下）

PET フィルム上にスクリーン印刷によって作製したカーボンインク電極の電気化学的前処理条件、各電極への印加電圧および対向させる電極間距離の検討を行なった。

### (2) 電気化学的手法による活性酸素発生

Cytochrome c は、 $O_2^-$  と反応することで還元型 Cytochrome c に変化し、550nm の吸光度が増加することが知られている。そこで、この反応を利用して、電気化学的にスクリーン印刷電極上で  $O_2^-$  が発生していることを確認した。本実験では、電極上に  $-0.9V$  vs.  $Ag/AgCl$  の電圧を印加し、 $0.015mM$  Cytochrome c 溶液を作用させ、分光光度計を用いて、10分ごとに波長  $200 \sim 900nm$  の範囲で溶液の吸収スペクトルを測定し、550nm 付近の吸光度変化を観測した。

### (3) 標準抗酸化性物質（カテキン類）による測定システム評価

開発した抗酸化活性測定システムの評価を行なうため、標準試料として各種濃度に調製したカテキン（C）、エピカテキン（EC）、エピカテキンガレート（ECg）、エピガロカテキン（EGC）、エピガロカテキンガレート（EGCg）を用い、従来法である DPPH 法と比較して検討した。

### (4) 食品の抗酸化活性測定と従来法との比較検討

本測定システムの有効性を確認するため、緑茶・紅茶・ウーロン茶飲料など 13 件、イチゴ、リンゴ、レモンなど果実 3 件、シソ、ピーマン、ニンジン、ほうれん草、パプリカ、トマト、など野菜 6 件、ワイン 2 件の試料を用いて抗酸化活性の測定を行い、DPPH 法あるいは、抗酸化活性測定の対象となる活性酸素種を電極法と同様に  $O_2^-$  にするため WST-1 法を用いて比較実験を行なった。

## 4. 研究成果

### (1)カーボンインク電極の特性評価および測定システムの最適化

本研究で用いたスクリーン印刷電極の作用極はカーボンインクで作製しており、親水性に乏しい。一般に、炭素電極表面には、含酸素官能基が存在しており、酸化処理をすることで、官能基密度を増加させ、電極表面に親水性の基をつけることで、水に極めて馴染みやすくなる。そこで、電気化学的前処理として、スクリーン印刷電極に電圧を印加し、カーボンインク電極表面を処理し、親水性を高め、スクリーン印刷電極の感度を上げることにした。リン酸緩衝溶液中でカソード処理、アノード処理をそれぞれ 300 秒行なったとこ

る電極の感度上昇が確認できた。この電極をスペーサーを介して対向させ図1のような抗酸化活性計測用電極システムを作製した。

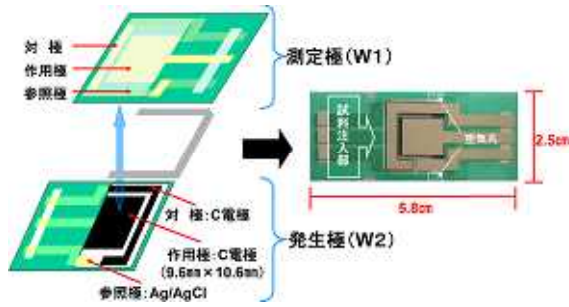


図1 抗酸化活性計測用電極システム

この電極システムの発生極側(W2)に-0.9V vs. Ag/AgCl の電圧を印加し、一方、この電極と対向して近接する測定極(W1)に+1.1V vs. Ag/AgC の電圧を印加して、酸化電流を測定した結果を図2に示す。また、測定は、試料を0.1MKCl水溶液に溶解し、これを130 $\mu$ L注入して行なった。測定後の溶液をFluoro H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Kit (CTI社製)で分析した結果、この酸化電流値は過酸化水素に起因するものであることが明らかとなった。また、W2に電圧を印加しない場合には、この応答電流が観測されない。これらのことは、発生極側(W2)に負の電圧を印加することでO<sub>2</sub>が発生し、これが、不均化反応によって過酸化水素となり微小距離にある測定極(W1)で酸化電流となって観測されたものと思われる。一方、ここにカテキンのような抗酸化性物質が存在するとこの応答電流値が低下することが明らかとなった。そこで本実験では、抗酸化活性を以下のように定義した。

$$\text{抗酸化活性}(\%) = (I_1 - I_2) / I_1 \times 100$$

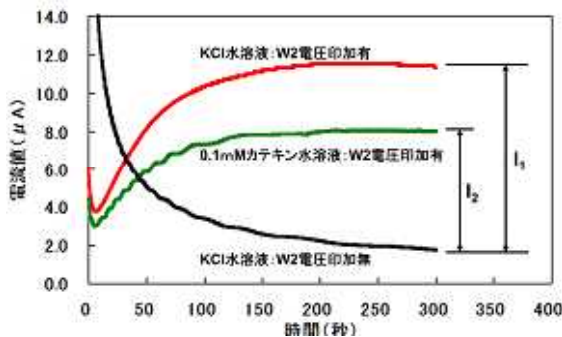


図2 測定システムの応答電流

また、各電極への印加電圧および対向させる電極間距離の検討を行なった。この結果、W1への印加電圧は+1.1V vs. Ag/AgCl、W2への印加電圧は-0.9V vs. Ag/AgCl、対向させる電極間距離は近接するほどI<sub>1</sub>の電流値が増

加したが、再現性を考慮し240 $\mu$ m(変動係数3%)とした。

### (2) 電気化学的手法による活性酸素発生

Cytochrome c (SIGMA社製、馬心臓由来) 15 $\mu$ M/0.1MKCl溶液に-0.9V vs. Ag/AgClの電圧を印加し、10分毎に200~900nmでの吸収スペクトルを測定した。図3に示すように電圧印加後20分で550nmの還元型Cytochrome cの特征的ピークの増加が認めら

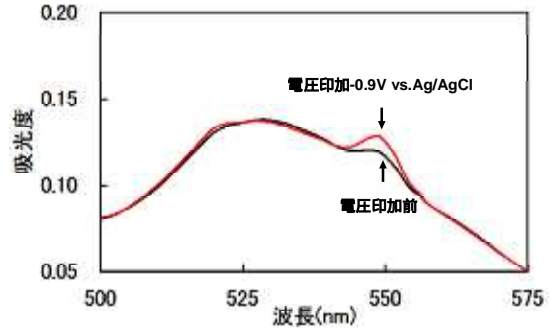


図3 還元型 Cytochrome c の吸収スペクトル

れた。これにより、W2電極上でO<sub>2</sub>が発生していることが確認された。図2においてカテキン水溶液の応答電流値が減少したことは、カテキンがO<sub>2</sub>の定常的拡散が抑制し、不均化反応によって発生する過酸化水素量が減少していることを示唆している。

### (3) 標準抗酸化性物質(カテキン類)による測定システム評価

標準試料として各種濃度に調製したカテキン(C)、エピカテキン(EC)、エピカテキンガラート(ECg)、エピガロカテキン(EGC)、エピガロカテキンガラート(EGCg)を用い、本システムで抗酸化活性を測定した。また、同様にDPPHにより測定し両者の相関関係を明らかにした。図4は、カテキン水溶液濃度とO<sub>2</sub>消去活性率の関係を示したものである。

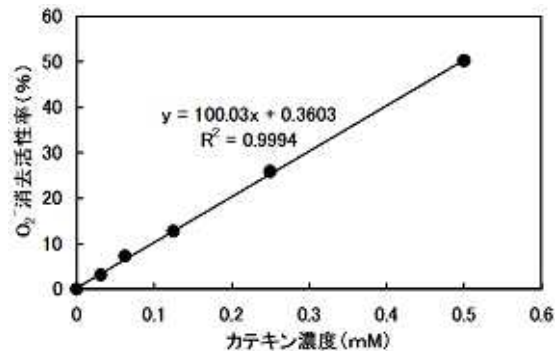


図4 カテキン濃度とO<sub>2</sub>消去活性率の関係

カテキン濃度と本システムで測定したO<sub>2</sub>消去活性率(抗酸化活性)には、直線的相関が

認めら、カテキン濃度の増加とともに抗酸化活性の値も増加した。また、同濃度の各種カテキン類の抗酸化活性を測定したところ C、EC がほぼ同等の活性を示し、次いで EGC、EGCg と活性が高くなっていき、ECg が最も高い活性を示した。C と EGCg の抗酸化活性を比較すると、C よりも EGCg の方が高い値を示した。これは一般に言われている C と EGCg の抗酸化活性の関係と一致している。これらの結果から、本測定システムによりカテキン濃度による抗酸化活性の違いあるいは種々のカテキン類における抗酸化活性の強度の比較が可能であることが示唆された。カテキン類の構造式と抗酸化活性とを併せて考えると、一般に 5' の位置に水酸基がついている EGC および EGCg、いわゆるピロガロール型カテキンは、5' 位に水酸基の無い EC および ECg、いわゆるカテコール型カテキンに比べ、その抗酸化活性は高く、また 3 位に没食子酸のついているガレートカテキン類のほうが、没食子酸基のないものよりわずかながら抗酸化活性が高いと言われている。本実験の結果では既知の事実と同様に、カテコール型の EC よりもピロガロール型の EGC の方が活性は高く、また EC、EGC よりも、ガレートカテキン類の ECg、EGCg のほうが高い活性を示したことから、各種カテキン類の抗酸化活性を識別できることが明らかとなった。また、本測定システムの抗酸化能測定値と従来法である DPPH 法との相関を確認した結果、両者の間に直線的相関（寄与率  $R^2=0.9652$ ）が得られた。

#### (4) 食品の抗酸化活性測定と従来法との比較検討

緑茶飲料を用いた測定を行う際、緑茶飲料には酸化防止剤としてビタミン C であるアスコルビン酸が添加されているため、測定極の W1 に印加している 1.1V の電圧では、アスコルビン酸の酸化分解が起こり、これが妨害電流となって正確な測定が行えない。また、緑茶飲料ばかりでなく各種食品に含まれるアスコルビン酸も同様で、このアスコルビン酸による影響を排除するため、抗酸化活性を計測する際には、20 倍以上希釈することとした。

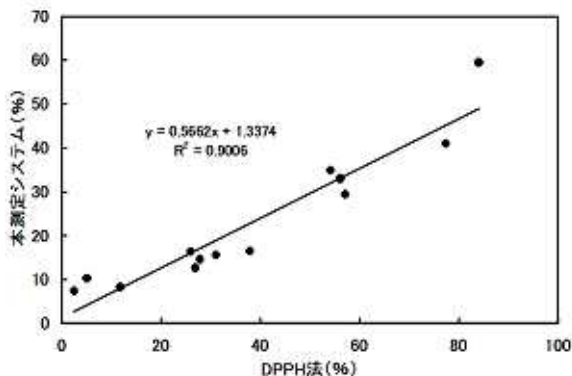


図5 各種茶飲料の抗酸化活性測定と DPPH 法との相関

まず、緑茶・紅茶・ウーロン茶飲料など 13 件の測定を行い、DPPH 法と比較検討した。これを図 5 に示す。同様にシソ、ほうれん草、パプリカ、トマト、レモンについては DPPH 法、イチゴ、リンゴ、シソ、ピーマン、ニンジンについては WST-1 法を用いて比較実験を行なった。いずれの方法においても直線的相関が得られ寄与率 0.95 以上であった。また、アルコール飲料である赤、白ワインを測定したところ、アルコールが電極応答における妨害物質となることが判明した。そこでワインと同濃度のアルコール水溶液を基準として測定を行ったところ、白ワインに比較して赤ワインの抗酸化活性が高く、アルコール飲料でも本システムで計測できることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

阿部真由子・伊藤真理・大熊廣一、抗酸化活性計測用センサの開発とアルコール飲料への応用、食分分析研究会、2009 年 9 月 30 日、東京

伊藤真理、増子貞光、大熊廣一、抗酸化活性計測用センサの開発と高感度化、食分分析研究会、2008 年 9 月 10 日、東京

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大熊 廣一 (OKUMA HIROKAZU)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：30297733

(2) 研究分担者 (0)

(3) 連携研究者 (0)