

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05816

研究課題名(和文) クーロメトリーを利用した新規抗酸化活性測定法の開発

研究課題名(英文) Development of new antioxidant activity assay using coulometry

研究代表者

堀田 弘樹 (Hotta, Hiroki)

神戸大学・海事科学研究科・准教授

研究者番号：80397603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：天然ポリフェノールを対象に、それらのフロー全電解生成物の解析を行ったところ、酸化に伴う後続反応によって還元力を再度獲得する物質や、後続反応により不活性化物質、また後続反応を持たない物質などに分類できることが分かった。DPPHラジカル消去反応においても同様に抗酸化剤により異なる反応機構でラジカル消去が進行していることが観察された。反応生成物に焦点をあてて、抗酸化活性評価を行う必要性を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの抗酸化活性評価法が知られているが、各評価法間の明確な相関性は必ずしも明らかではない。この理由の一つとして、反応対象ラジカル種と抗酸化剤の反応機構が、それぞれのラジカル種に対して異なることが考えられる。反応生成物の解析をもとに反応機構を検討することで、様々な活性評価法での評価機構の違いを明確にできると考えられる。本研究では、電気化学酸化とDPPHラジカル消去反応における、反応機構の類似点・相違点を明らかにすることで、反応機構の解明が抗酸化活性評価に重要であることを示すことができた点で大きな意義を持つものであると考える。

研究成果の概要(英文)：Natural polyphenols were analyzed for flow electrolysis products and classified as follows. Substances that regain reducibility by subsequent reactions that accompany oxidation, substances that deactivate by subsequent reactions, and substances that do not have subsequent reactions. Also in the DPPH radical scavenging reaction, it was similarly observed that radical scavenging proceeds in different reaction mechanisms depending on the antioxidant. The necessity of focusing on reaction products (reaction mechanism) to evaluate antioxidant activity was found.

研究分野：分析化学

キーワード：抗酸化剤 クーロメトリー 反応機構 酸化生成物 ポリフェノール HPLC DPPH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗酸化剤は、生体内で発生する不安定化学種であるラジカル化合物 ($\text{HO}\cdot$ や $\text{O}_2\cdot^-$ などの活性酸素種、ペルオキシラジカル $\text{ROO}\cdot$ など) を除去する働きを担っている。SOD (Superoxide dismutase) などの酵素や、ビタミン C、ポリフェノール類などが抗酸化剤の代表例である。中でも植物由来の抗酸化剤は、ファイトケミカルと呼ばれ、炭水化物・タンパク質、脂質などに続く 7 つ目の栄養素と表現される。そのため抗酸化活性を評価・測定する手法の開発は必要性が高く、これまで数多くの手法が報告されている。それらは、水素原子 (水素イオン+電子) の移動を観察する HAT (Hydrogen Atom Transfer) 測定と、電子移動のみを観察する SET (Single Electron Transfer) 測定に大別される。HAT 測定の代表例には、細胞膜の酸化を評価する過酸化脂質量などの *in vivo* 測定や、ペルオキシラジカル $\text{ROO}\cdot$ やヒドロキシラジカル $\text{HO}\cdot$ などの生体内で発生するラジカルの除去活性を *in vitro* で評価する ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法や HORAC (Hydroxy Radical Absorbance Capacity) 法がある。SET 測定には、生体には存在しないが扱いが簡便な有機ラジカル (DPPH などが知られている) の除去活性などがあり、簡便法として広く用いられている。これらの測定手法間の相関は、条件に依存するなど必ずしも高くないため、現状、複数の手法を併用して活性を評価することが一般的である。

(2) 一方、抗酸化剤の還元剤としての物理化学的性質を評価する電気化学測定も、古くから抗酸化活性評価基準として検討されてきた。しかし標準酸化還元電位 E° は、上記の HAT、SET 測定とともに相関が低く、一般的に電気化学測定では抗酸化活性を十分に評価できないと考えられてきた。ところが申請者は、酸化に伴う後続化学反応の重要性を見出し、クーロメトリーにより測定された (後続反応生成物を含む) 酸化電子数 n が DPPH 除去活性 (SET 測定) と高い相関があることを見出した (H. Hotta, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1572, 123–132.)。すなわち、酸化に伴って進行する後続化学反応は、抗酸化活性に強く寄与しているため、その効果を十分に評価する必要があることを示している。

2. 研究の目的

新規な抗酸化活性評価法として、酸化 (ラジカル消去反応) に伴う後続化学反応の寄与を十分に評価できる測定法 (評価法) を開発することが最終的な目的である。この目的を達成するために、様々な抗酸化剤について、それらの抗酸化反応の結果生じる反応生成物を明らかにする (すなわち、後続化学反応の機構を明らかにする) 必要がある。合わせて各活性評価法において、後続化学反応がどの程度寄与しているかを明らかにする必要がある。後続化学反応の機構を明らかにし、DPPH 法やその他の方法で得られる反応生成物を解析し、それらの共通性または相違点を見出すことが重要である。本研究では、カフェイン酸をはじめとするヒドロキノン骨格をもつ抗酸化剤について、酸化に伴う後続化学反応の機構解明と、DPPH などのラジカル消去活性とその後続化学反応とのかかわりを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 試料を完全に電解することができるクーロメトリックセルを用いて全電解を行った試料を、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) にて分離検出した。これにより酸化生成物の解析を行い、酸化反応機構を解明することで、抗酸化活性評価法を確立するための指針を得た。反応機構の解明には、酸化生成物を分離後、様々な検出法にて検出を行い、その結果を総合的に判断して生成物の解析を行うことが必要である。本研究では、紫外可視吸収スペクトル測定、赤外吸収スペクトル測定、質量分析測定、電気化学測定により検出・解析を行った。

(2) DPPH 消去反応における生成物の解析を、電気化学測定により行った。DPPH 溶液に抗酸化剤溶液を注入した際の、DPPH ラジカル消去反応過程を、電気化学測定と分光測定により追跡した。

4. 研究成果

(1) まず第一に、抗酸化剤の一種であり、*o*-ヒドロキノン骨格を持つ抗酸化剤の代表例であるカフェイン酸について分析を行った。電解酸化した試料溶液を HPLC により分析したところ、10 種類を超える非常に多量の酸化生成物が生成することが明らかとなった (図 1 青線)。

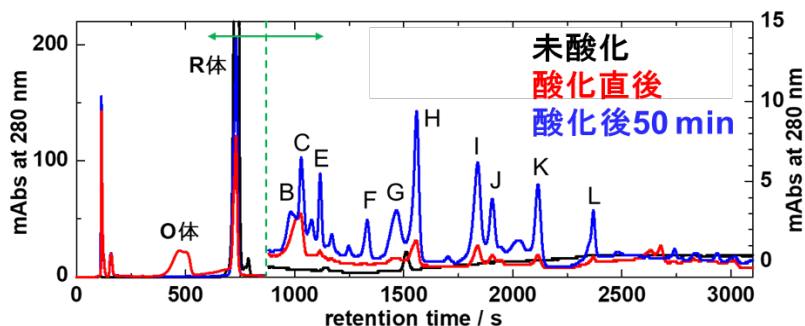


図 1. カフェイン酸酸化生成物の HPLC 解析

そのほとんどが多量化による生成物であり、2量体と一部3量体の生成が確認できた。これらの多量体の生成量は、電解酸化後分析するまでの時間に依りて変化することが分かり、直ちに生成しそのまま比較的安定に存在する物質、生成後10~30分程度で消滅していく物質、その消滅と合わせるようにして生成する物質など性質の異なるものが見られた。多量体の生成以上に注目すべき点は、元のカフェイン酸(すなわちo-ヒドロキノン体)が、電解酸化後に徐々に生成していることであった。このことは、カフェイン酸が酸化後、時間経過に伴って再度ものと構造に戻っていることを表している。十分に酸化されたものであるにも関わらず(始めに全電解しているため未反応のものが残存している

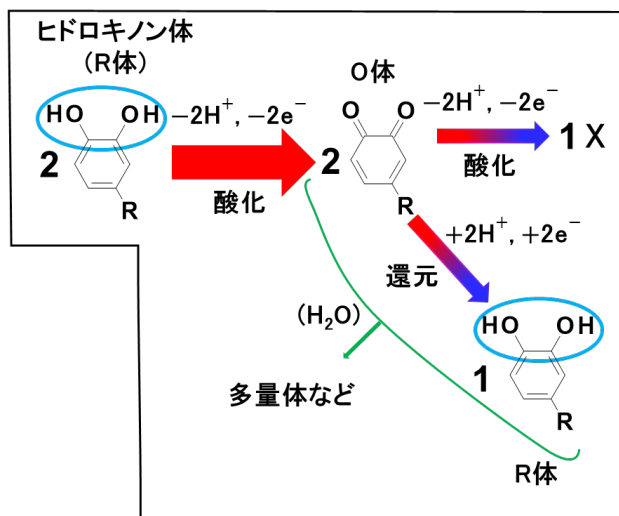


図.2 推定されるo-ヒドロキノン類の酸化反応機構

ることではない) 時間が経過すると元の還元体に戻るという非常に不思議な現象であった。この反応に溶媒である水の関与を疑ったが、アルコール、アセトニトリルなど水の少ない溶媒環境下であっても、還元体の再生成反応は同様に進行することが分かった。現在のところ何が還元剤となり、カフェイン酸酸化体が還元されているのか明らかな日程内。しかしカフェイン酸電解酸化生成物に共通して当てはまることは、ほとんどすべての生成物が還元力を持っている点であった。試料が十分に酸化されたあとに生成した化合物が、再び還元力を持っていることから、酸化後の後続化学反応による還元力の再獲得反応が起こっていることを見出した。カフェイン酸の他、カテコールやクロロゲン酸など、o-ヒドロキノン骨格を持つ抗酸化剤がこのような後続化学反応を起こすことを見出した。p-ヒドロキノンにおいてもこのような還元力の再獲得反応が多少観察されたが、m-ヒドロキノン(レゾルシノール)では、同様の反応は全く観察されず、酸化に伴い不可逆な分解過程が進行していることが示された。この解析結果から、推測されたo-ヒドロキノン体を基本骨格とするポリフェノールの酸化機構を図2に示す。

酸化によりヒドロキノン体(R体)がキノン体(O体)になるが、それは自身の反応により約半分がR体に戻り、残り半分がさらなる酸化生成物を生成する。すなわち不均化反応のような過程をたどっているのではないかと推測している。酸化に伴う後続化学反応により還元力を再獲得することができるo-ヒドロキノン類は、抗酸化剤として非常に強い活性を示すことを示唆している。以上のことから、後続化学反応の寄与を活性評価に含めることの必要性は大きいと考えられる。

なお、多量体の生成には水の存在が重要であることが観察されており、水が少ない溶媒環境下では、多量体の生成量が著しく低下することが観察された。

(2) 数種の抗酸化剤について、DPPH ラジカルとの反応を詳細に観察したところ、以下のような三つの反応パターンに分類できることが分かった。

一つは(i) 抗酸化剤、DPPH 共に可逆な電子移動反応を起こすもの(p-ヒドロキノンやゲンチジン酸がこれに分類される)、二つ目は(ii) DPPH とは電子移動のみであるが、抗酸化剤自身が後続化学反応により最終的には酸化還元不活性になるもの(カフェイン酸、アスコルビン酸、水溶性ビタミンE(トロロックス)、エラグ酸などがこれに相当する)、さらに、(iii) 抗酸化剤もDPPHも不活性化していくもの(すなわちDPPHと抗酸化剤の付加反応が進行していることが示唆される、カテキンやレゾルシノールがこの化合物群に分類された)であった。

(i) は後続化学反応を起こさない化合物であり、DPPH ラジカル消去反応が物質質量比で、抗酸化剤:DPPH = 1:2で進行するものであった。ラジカル消去反応としては進行が緩慢であり、一般的には抗酸化活性が高いとは分類されない。

一方の、(ii) (iii) は後続化学反応を起こす化合物群であった。(ii) は比較的迅速にラジカル消去反応が進行し、抗酸化剤の注入後ただちにDPPH ラジカルの消去反応が進行した。反応の物質質量比が、抗酸化剤:DPPH = 1:2であるもの(アスコルビン酸、トロロックス)と、1:3以上を示すもの(カフェイン酸、エラグ酸など)があり、後者は一分子で非常に多くのラジカルを効率よく消去することができる。これらの抗酸化剤は、DPPHと反応した後、最終的に酸化還元不活性化することで、平衡論的に反応が一方に進行することが、反応速度が速いと観察される理由であると考えられる。かつ、不活性化することで抗酸化剤の生成物が、逆反応を含む、それ以降の反応を進行させない(すなわち反応を停止させる)ことが、抗酸化反応を考えるうえで重要であると考えられる。(iii) については、比較的速い過程の反応と、その後進行する遅い反応が混在していることを示唆する結果が得られている。電子移動による迅速な

ラジカル消去反応と、DPPH ラジカルとの付加反応を含む比較的遅い後続化学反応が拮抗していることが想定される。詳細な反応過程は現在のところ解明できていないが、最終的に不活性化していることが推測される。これらの実験結果から、後続化学反応がラジカル消去反応に重要な要素であることが示された。

以上の結果から、電気化学測定（主としてクーロメトリー測定）を用いることで、抗酸化剤の酸化に伴う後続化学反応を、十分に活性評価に取り入れることができると示した。今後は、その他の抗酸化活性評価法における生成物を分析し、抗酸化能を評価するためには後続化学反応の寄与を十分に考慮しなければならないことを示していきたいと考えている。実際に生体中での反応をより正確に予測するためには、共存物質が多く含まれる複雑系での反応を検討する必要がある。ポリフェノール類は金属との錯体を生成することも知られている。ホウ酸などの非金属イオンとの相互作用もよく知られている。これらの相互作用がラジカル消去活性に及ぼす影響は非常に大きいと考えられる。今後は複雑系での反応を念頭に検討を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hiroki Hotta, Kenji Matsumoto, Evaluation of antioxidant activity by flow injection analysis with electrochemical detection, Journal of Flow Injection Analysis, 査読あり、35(2), 2018, 49-51.
[https://aitech.ac.jp/~jafia/japanese/jfia/contents/35_2/HP/JFIA35\(2\)\(2018\)PP.49.pdf](https://aitech.ac.jp/~jafia/japanese/jfia/contents/35_2/HP/JFIA35(2)(2018)PP.49.pdf)

〔学会発表〕(計 13 件)

松本健嗣、堀田弘樹、木村行宏、大塚利行、Product analysis of electrochemical oxidation of polyphenols、日本化学会第 99 春季年会、2019.

松本健嗣、堀田弘樹、木村行宏、大塚利行、ポリフェノールの電解酸化機構の解明、若手フロンティア研究会、2018.

松本健嗣、堀田弘樹、木村行宏、大塚利行、全電解-HPLC によるポリフェノール電解酸化機構の比較、第 64 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会、2018.

堀田弘樹、松本健嗣、田中晴之、サイクリックボルタンメトリーによる抗酸化剤の DPPH ラジカル捕捉反応過程の追跡、第 64 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会、2018.

松本健嗣、孟広治、福士恵一、堀田弘樹、ポリフェノールの酸化機構の解明、日本分析化学会近畿支部 65 周年記念講演会、2018.

松本健嗣、堀田弘樹、福士恵一、木村行宏、大塚利行、ポリフェノールの電解酸化生成物の比較、日本分析化学会第 68 年会、2018.

松本健嗣、堀田弘樹、木村行宏、大塚利行、カフェイン酸の電解酸化に伴う再還元能獲得に対する溶媒の影響、第 78 回分析化学討論会、2018.

松本健嗣、木村行宏、大塚利行、山崎祥子、堀田弘樹、カフェイン酸の電解酸化機構の解析、第 63 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会、2017.

松本健嗣、堀田弘樹、木村行宏、大塚利行、カフェイン酸の電解酸化機構の解明、第 66 回分析化学会年会、2017.

堀田弘樹、宮崎宣行、二見奈緒子、植原誠之、角田欣一、溶液/多孔質膜界面における電子移動反応の分光検出、第 66 回分析化学会年会、2017.

堀田弘樹、宮崎宣行、二見奈緒子、植原誠之、角田欣一、溶液/多孔質膜界面で起こる電子移動反応の分光検出、第 68 回コロイドおよび界面化学討論会、2017.

堀田弘樹、和泉杏奈、中島雄飛、三好憲、松本健嗣、カフェイン酸の紫外線照射に伴う電気化学応答の変化、第 77 回分析化学討論会、2017.

松本健嗣、堀田弘樹、山崎祥子、カフェイン酸の酸化機構の解明、第 77 回分析化学討論会、2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~hihotta/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。