

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：31311

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580142

研究課題名（和文） 抗酸化成分の目視検出時間計測定量法の開発研究

研究課題名（英文） Development of a simple determination of antioxidants by visual detection

研究代表者

赤坂 和昭 (AKASAKA KAZUAKI)

尚絅学院大学・総合人間科学部・教授

研究者番号：10201881

研究成果の概要（和文）： 3,6-dihydroxyxanthane の自己触媒的発色反応は、抗酸化化合物により濃度依存的に阻害された。この反応を、TLC の検出反応として応用し、スポットの消失するまでに要した時間を目視により計測することにより抗酸化成分の定量が可能であった。この方法を利用し、市販の飲料中のビタミン C を定量する方法を開発した。更に、脂溶性のビタミン E の簡便な分別定量法を開発し、揚げ油の劣化の程度をビタミン E の減少量から計測することができた。

研究成果の概要（英文）： A visual detection method using autocatalytic reaction system of 3,6-dihydroxyxanthane was successfully applied for the simple visual determination of L-ascorbic acid in beverages and Vitamin E in edible oils, respectively. It was also possible to estimate the oxidation of fried oils easily by determination of Vitamin E by the proposed method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
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：目視定量法、簡易定量法、抗酸化化合物、ビタミン C、ビタミン E、薄層クロマトグラフィ

1. 研究開始当初の背景

生体内に於ける活性酸素・過酸化脂質の生成は様々な疾患・老化との関連から、また食品中では食品の安全性・品質を大きく損なうことから非常に大きな問題として注目されている。食品中には、酸化を抑える多様な抗酸化成分が含まれている。これらの成分の中には、ビタミン C、ビタミン E、カテキン類などのように抗酸化性だけでなく、他の多様で重要な生物活性を有するため、非常に注目

されているものも数多い。

物質量の計測に「時間」を用いた定量法が数例報告されている。四ッ柳らは、Co(II)-フタロシアニン錯体が微量の Co(II) を触媒として分解される自己触媒反応を用い、溶液の発色を目視検出し、発色までの時間計測により高感度で Co(II) を分析する方法を報告している (*Chem. Lett.*, 349(1995))。この方法では、反応を早める触媒がネズミ算式に作り出されるため、一定時間後に一気に反応

が終了し、初期に存在する触媒量を誘導期の長さから求めることができる。最近、五十嵐らは、同様の方法でバナジウムやニッケル、過酸化水素など無機化合物を定量した例を報告している (*Chem. Lett.*, 36, 136 (2007); *Anal. Chim. Acta*, 590, 245 (2007); *分析化学*, 57, 131 (2008))。目視検出・時間計測法は目とストップウォッチで定量を行うもので、特殊な器具・装置を必要としない低コスト・簡便な分析法であるが、適応の可否は、特殊な反応系の開発・構築にかかっており、適応できるのは極一部の場合に限定されていた。

申請者は、3,6-dihydroxyxanthane (無色・無蛍光性) の酸化生成物である6-hydroxy-3-fluorone (黄色、蛍光性) が光増感性を示し、光照射下で自己触媒的に試薬の酸化反応が進行し、一気に発色が進むことを明らかにした。種々の抗酸化性化合物は、Fluoroneの生成を濃度依存的に抑制したことから、これを目視検出・時間計測による簡便・経済的な定量法へ展開できると考えた。

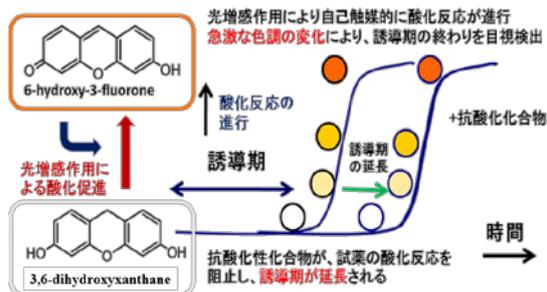


図1 3,6-Dihydroxyxanthane の発色反応の抗酸化成分による遅延

2. 研究の目的

抗酸化化合物の中には、他の多様な生物活性を有しているものも多く、それらの簡便な分析法に対する需要は高いと考えられる。

本研究では、抗酸化成分による誘導期の延長を目視検出する、sub-nmol レベルの時間計測量法の確立と食品・生体試料への応用により実用性の評価を目的とし、水溶性抗酸化化合物としてビタミンCを、また脂溶性抗酸化化合物としてビタミンEの簡便な薄層クロマトグラフィー (TLC) 目視検出時間計測量法の開発、並びに実試料への応用による実用性の評価により、簡便かつ経済的な実用的分析法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

3,6-dihydroxyxanthane の自己触媒的発色反応を用いた目視検出・時間計測法による抗酸化成分のTLC一定量法の開発を目的とし、(1) 発色反応の基本特性の解析、(2) TLCプレート上での反応特性の評価、(3) 水溶性抗酸化成分であるL-アスコルビン酸

(ビタミンC) の定量法の確立、及び(4) 脂溶性抗酸化成分であるビタミンE (トコフェロール類) の定量法の開発と油脂劣化評価への応用展開を行った。

(1) 発色反応の基本特性の解析

抗酸化成分による誘導期延長反応を定量分析に応用するには、反応の基本特性を更に詳細に明らかにする必要がある。このため、マイクロプレートリーダー、HPLCを用いて溶液系における3,6-dihydroxyxanthaneの酸化反応について定量的な検討を行い、反応の基本特性の解析(反応メカニズム、反応条件の影響など)を行うとともに、抗酸化能評価の簡便解析法への応用について検討した。

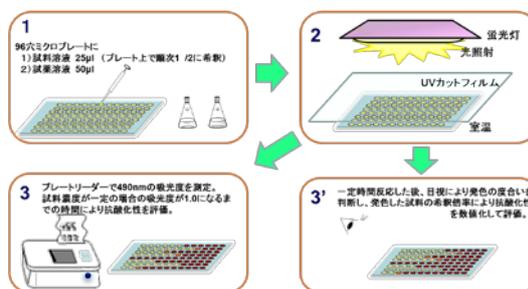


図2 ミクロプレートを用いた抗酸化能評価法

(2) TLCプレート上での反応特性の評価

試薬自身は水に不溶であることから、マイクロプレートを用いた系で水溶性の抗酸化化合物を分析することは困難であった。そこで、シリカゲルTLCプレートを反応の場として用いた水溶性を含む抗酸化化合物の発色反応特性について検討を行った。

試料溶液 (BHT、ビタミンE、ビタミンC、カテキン類など) をTLCプレートにスポットし、減圧乾燥した後、試薬溶液をスプレー噴霧し、光照射下での発色の様子をビデオ撮影し、誘導期の目視検出により誘導期の長さ(時間)から成分を定量するための基本条件を設定した。

(3) L-アスコルビン酸の目視定量法の開発

飲料中に含まれるL-アスコルビン酸を、TLCにより他の抗酸化成分と分離し、反応試薬を噴霧、光照射下で発色する様子をビデオ撮影し、誘導期の長さからL-アスコルビン酸を定量する方法を開発した(図3)。

果汁、野菜ジュース、お茶などの飲料中に含まれ、L-アスコルビン酸の分析に影響を与えると考えられる主要な共存成分であるカテキン類とのTLC分離、及び、目視評価における個人間のばらつき、計測法の再現性、添加回収実験などにより定量性評価を行い、分析条件の最適化を行った。

更に、市販飲料23種について、本法と市

販酵素キット法により L-アスコルビン酸を分析し、定量値を比較し、本法の実用性の評価を行った。

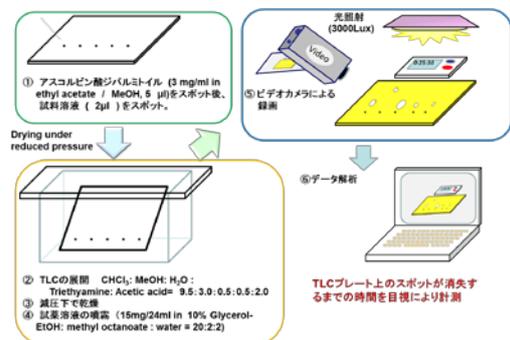


図3 アスコルビン酸のTLC法による定量

(4) 脂溶性ビタミンE (トコフェロール類) の分別定量法の開発と油脂劣化評価への応用

脂溶性抗酸化成分であるビタミンE (α-トコフェロール; α-Toco., β-トコフェロール; β-Toco., γ-トコフェロール; γ-Toco., δ-トコフェロール; δ-Toco.) の分離条件、及び目視検出定量の条件について検討し、定量性、再現性、添加回収実験により分析法の評価を行った。更に、市販油脂およびフライ調理に用いた油中のトコフェロール類の分析を行い、HPLC法による定量値との比較を行った。

4. 研究成果

(1) 発色反応の基本特性の解析

96穴マイクロプレートに、リノール酸メチル溶液及び3,6-dihydroxyxanthane溶液を採り、490nmの吸光度の変化をマイクロプレートリーダーで計測した。その結果、光照射下では、約60分の誘導期の後、吸光度の急激な上昇が認められ反応液は無色から黄色~橙色に変化した。一方、暗所で反応を行った場合は吸光度の増加は認められなかった。

この反応液中におけるリノール酸メチルヒドロペルオキシドの生成量をDPPP-HPLC法により測定した結果、光照射下では、吸光度の変化と同様、約60分の誘導期の後急激な増加が観察されたが、暗所では増加は認められなかった。一方、3,6-dihydroxyxanthaneの代わりに、その酸化生成物である6-hydroxyl-3-fluoroneを添加した場合は、光照射により、リノール酸メチルヒドロペルオキシドは、開始直後から直線的に増加したが、暗所では全く増加は認められなかった。以上の結果から3,6-dihydroxyxanthaneには光増感感はないが、その酸化生成物である6-hydroxyl-3-fluoroneは光増感作用を有す

ることを確認した。

3,6-dihydroxyxanthaneを加えた反応溶液に、更に抗酸化剤であるBHT (ブチルヒドロキシトルエン) を添加すると、BHTに対し濃度依存的に誘導期が長くなった。そこで、簡便な抗酸化性評価法構築に向け、他の抗酸化成分についても検討した結果、同様に濃度依存的に発色までの時間が遅延したことから、発色までの時間、或いは一定時間内で発色が確認された抗酸化成分の濃度から、抗酸化能を目視により評価することが可能であった (図4)。

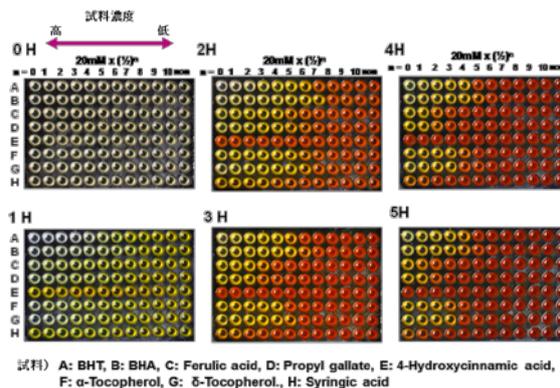


図4 ミクロプレートを用いた抗酸化性評価

(2) TLCプレート上での反応特性の評価
シリカゲルTLCプレートに試料溶液をスポットし、3,6-dihydroxyxanthane溶液を噴霧し、光照射の下で色調の変化をビデオで記録した。その結果、背景は時間の経過とともに黄色く発色したが、抗酸化化合物をスポットした部分は、発色せずに白く抜けたスポットとして観測された。一方、糖類や、システインを除くアミノ酸、有機酸などはスポットとして観測できなかった。

抗酸化成分のスポットは、光照射を続けると遅れて発色し、背景と同じ色になり、スポットは消失した。L-アスコルビン酸について、スポットが消失するまでの時間を誘導期として目視により計測し、濃度との関係について検討したところ、非常に良好な直線性が認められた。

(3) L-アスコルビン酸の目視定量法の開発

お茶や果汁、野菜ジュースなどの飲料中に含まれ、L-アスコルビン酸の分析に影響を与えると考えられる主要な抗酸化性を持った共存成分であるカテキン類とアスコルビン酸とのシリカゲルTLCによる分離について検討した。アスコルビン酸と同様、カテキン類も白く抜けたスポットとして検出されたが、クロロホルム/メタノール/酢酸/トリエチルアミン/水の混合溶媒系により、L-アスコルビン酸と分離することができた (図

5)。

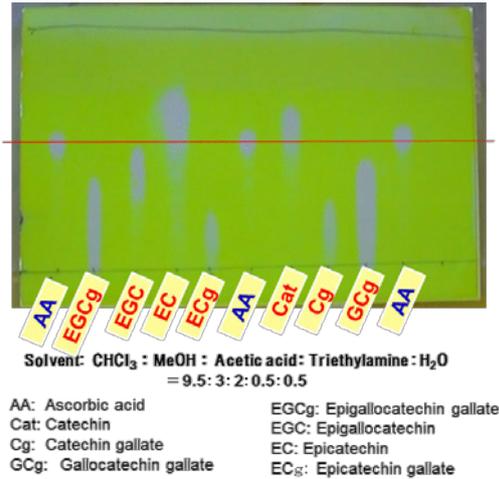


図5 TLCによるアスコルビン酸とカテキン類の分離

スポットが完全に消失した時間を誘導期の終わりとして、録画画像の解析により求めた。L-アスコルビン酸のスポット消失時間と濃度の関係の間には、5.0~20mMの濃度領域で良好な直線関係が認められた ($R^2=0.9944$)。一方、これよりも低濃度領域 (0.1~5.0mM) では直線とはならなかったが、2次関数により良好に近似することができた ($R^2=0.9975$) (図6)。

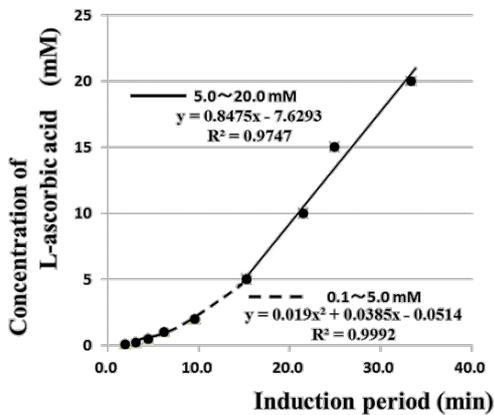


図6 L-アスコルビン酸の検量線

本法を用い、3種の飲料 (L-アスコルビン酸濃度 2.2~8.6mM) を5連で分析した測定値の相対標準偏差は5%以内であった。また、4種の飲料 (L-アスコルビン酸濃度 0.7~6.7mM) に対し、5.0mMのL-アスコルビンを添加した添加回収実験の結果、回収率は97~110%と良好な回収率が得られた。また、目視による誘導期の計測の個人によるばらつきを評価するため、8種の飲料 (L-アスコルビン酸濃度 0.25~6.5mM) の発色の様子を検量線のための標準試料を含め記録した録画

データを、7名が独立に解析し、アスコルビン酸濃度を求めた結果、測定値の相対標準偏差はいずれも7%以内であった。

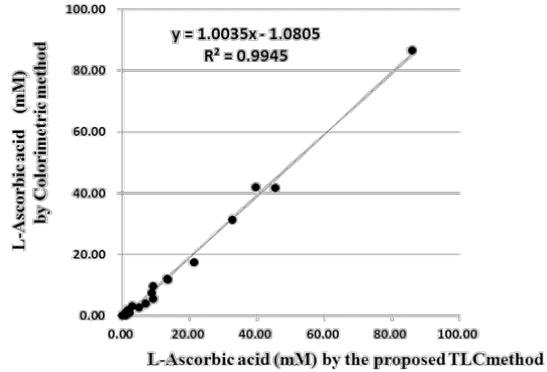


図7 TLC法とF-キット法によるL-アスコルビン酸測定値の比較 (n=23)

市販飲料23種 (茶類7種、果汁5種、果汁入野菜ジュース3種、スポーツ・健康飲料等8種。L-アスコルビン酸濃度 0~86mM) について、本法と市販の酵素キット法 (F-キット L-アスコルビン酸; R-Bicpharm AG) により分析を行い、定量値を比較した結果、両方法間に傾き1の非常に良好な直線性が認められた ($R^2=0.9945$, 図7)。

本法は、 $2\mu\text{l}$ の微量の試料を用いるだけで、0.1~20mMの濃度範囲で飲料中のL-アスコルビン酸を、特殊な装置を用いることなく分析することを可能とした。更に、カテキン類を多く含む茶類についても、添加回収率は97%で、測定値もF-キット法と非常によく一致し、十分に実用的な簡便測定法である。

(4) 脂溶性ビタミンE (トコフェロール類) の分別定量法の開発と油脂劣化評価への応用

ビタミンEは4種のトコフェロール類 (α -, β -, γ -および δ -トコフェロール) からなり、それぞれ抗酸化性、安定性が異なる。このため、4種のトコフェロール類のTLCによる分離について検討した。シリカゲルTLCを用い、クロロホルム/イソオクタン系の溶媒で展開・検出したところ、図8に示したように、各トコフェロールは白く抜けたスポットを与え検出することができたが、 β -トコフェロールと γ -トコフェロールは同じRf値を示し分離することができなかった。この2つの成分は位置異性体で、TLCで分離することは難しく、また β -トコフェロールを主要成分として含む油は小麦胚芽油など分布が限られていることから、本研究ではこれらをまとめて ($\beta + \gamma$)-トコフェロールとして計測することとした。

スポットが完全に消失した時間を誘導期

の終わりとして、録画面像の解析により求めた。各トコフェロールの検出感度はアスコルビン酸より約 20 倍程度高かった。

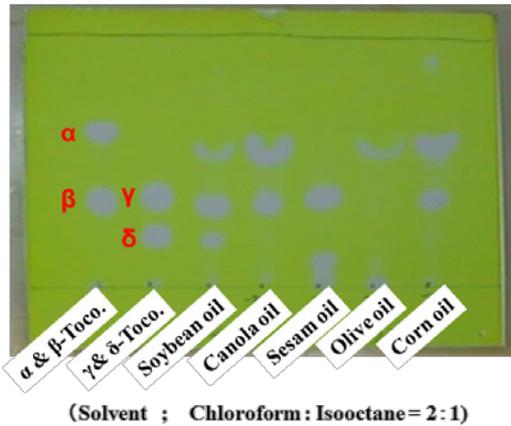


図 8 トコフェロール類の TLC による分離

スポット消失時間と濃度の関係は、いずれの濃度領域においても直線とはならなかったが、EXCEL2010 による近似式計算により、2 次関数で非常によく表現され、2.5~62.5 μg/ml の濃度範囲で相関係数 R^2 は 0.995~0.998 であった(図 9)。

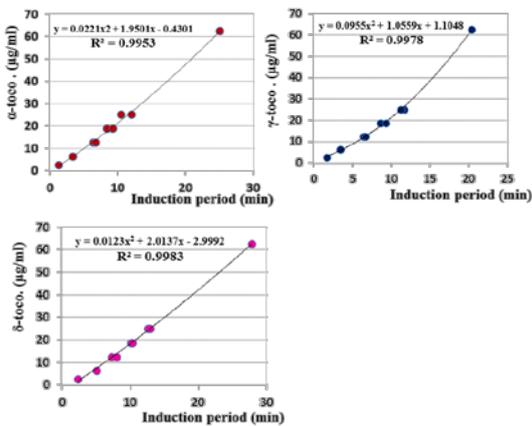


図 9 トコフェロール類の検量線

トコフェロール類の 0.25 mg/10ml および 1.25mg/10ml 溶液を分析した際の誘導期の計測値の相対標準偏差は 6%以下 (n=9) であった。市販の大豆油に標準トコフェロールをそれぞれ 0.595mg/g 添加した際の回収率は、93~106%で、その測定値の相対標準偏差は 2.5~5.7% (n=4 or 5) であった。

市販の新鮮な食用植物油 16 種およびポテトフライを揚げた大豆油(4 種)、キャノーラ油(4 種)の計 24 種について TLC 法と HPLC 法により測定したトコフェロール量を比較した。尚、HPLC 法においても、β-トコフェロールと γ-トコフェロールの和として評価した。図 10 に示したように、両方法間に非常に良好な相関性が認められ、本 TLC 法により

簡便・手軽にトコフェロール類の分別定量が可能であることを示すことができた。尚、ごま油については、HPLC 法で α-トコフェロールが妨害ピークにより分析困難であったため α-トコフェロールについては評価から除外した。

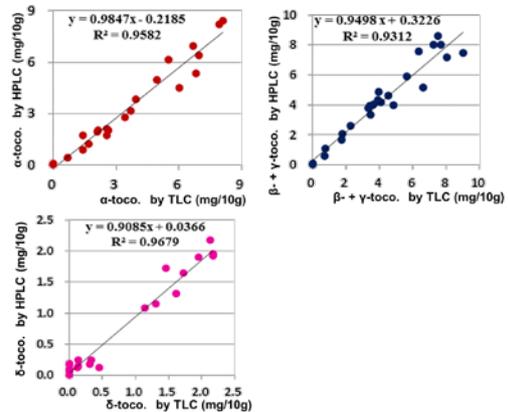


図 10 TLC 法と HPLC 法によるトコフェロール計測値の比較

本法の TLC 分析自体に必要な油の量は 100 μg 程度と非常に微量で分析が可能であり、測定結果は HPLC 法とよく一致したことから、簡易分析法として有効な方法と考えられた。

また、ごま油、米油、亜麻仁油などからは、標品とは異なるスポットが検出され、脂溶性抗酸化成分のスクリーニング法としても有効であることが期待できた。

ビタミン E は、ラジカル捕捉により脂質劣化を抑制するが、それに伴い自身は酸化され徐々に減少するため、ビタミン E の減少が酸化劣化の指標となることが期待できた。そこで、市販の大豆油およびキャノーラ油を用いフライドポテトを積算時間として 0~8 時間揚げ、TPM 値 7~26%の油を調製し、TPM 値とトコフェロール含量との関係について検討した。その結果、揚げ調理に伴い TPM 値は徐々に上昇し、その上昇に伴い、各油のトコフェロール類の濃度も減少し、TPM 値とトコフェロール濃度の間には負の相関性が認められ、トコフェロール量を指標とすることにより揚げ油の劣化程度を評価することが可能と考えられた。特に、TPM 値と総トコフェロール濃度間にも同様の負の相関性が認められたことから、油脂劣化判定では、分離操作を省いたスポットテストによる、より簡便、迅速な評価が可能と期待できた。

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)

〔雑誌論文〕(計1件)

1) Kazuaki Akasaka, "Simple Determination of L-Ascorbic Acid on TLC by Visual Detection Using Autocatalytic Reaction", *Analytical Sciences*, 2013, 29(5), 505-509.

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

〔学会発表〕(計3件)

- 1) 赤坂和昭、小笠原 敬香、橘内 美穂、鈴木 絵里加、松下 花織、八巻 光匡、「飲料中のアスコルビン酸の簡易定量法の開発」日本農芸学会2011年度大会(震災のため中止。要旨集発行、特許庁と国会図書館には納本済みにより学会は法的に成立)、要旨集発行 平成22年3月5日(p.78)
- 2) 赤坂和昭、「ビタミンCの目視時間計測法による簡易定量法の開発」日本分析化学会第61年会(2012年9月19日~21日、金沢大学)、講演要旨集 p.203
- 3) 赤坂和昭、細谷理奈「TLCを用いたビタミンEの簡易目視定量法」、日本農芸化学会2013年度大会、(2013年3月24日~27日、東北大学川内北キャンパス、仙台)、講演番号4A11a04

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤坂 和昭 (AKASAKA KAZUAKI)
尚絅学院大学・総合人間科学部・教授
研究者番号：10201881