

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00910

研究課題名(和文)食品の抗酸化能寄与成分の分析法であるオンラインHPLC-ORAC法の開発

研究課題名(英文)Development of an on-line HPLC-ORAC method for detection of antioxidant compounds in foods

研究代表者

竹林 純 (Takebayashi, Jun)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部・食品分析・表示研究室長

研究者番号：30421837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化能測定法であるOxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)法を高速液体クロマトグラフ(HPLC)法と組み合わせることで、食品に含まれる既知及び未知の抗酸化物質を網羅的に解析可能なオンラインHPLC-ORAC法を確立した。単一試験室による妥当性確認試験を行った結果、本法は、正確な定量には向かないものの、高い定性性を有することが示唆された。また、含有されている主たる抗酸化物質の種類が限られた検体については、その数と相対的な寄与率を明確に示すクロマトグラムが得られることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素・フリーラジカルが発症の一因となる、がんや動脈硬化をはじめとした種々の疾患の予防に、食品に含まれる多種多様な抗酸化物質が重要な役割を果たすことが期待されている。本研究にて確立したHPLC-ORAC法を用いることにより、食品に含まれる抗酸化物質の質(種類)及び量(活性)に関する情報を一括して得ることができる。得られたデータは、食品に含まれる既知及び未知の抗酸化物質を網羅的に示すものであり、食品の持つ抗酸化能が健康に及ぼす影響を、より深いレベルで理解することに寄与する。

研究成果の概要(英文)：An on-line high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the detection of known and unknown antioxidants contained in foods was developed. This new method, namely the on-line HPLC-ORAC method, combined an antioxidant assay by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method with HPLC. A single-laboratory method validation indicated that the developed method was not suitable for accurate quantification, but possessed the high qualitative ability. For samples with limited numbers of main antioxidants, a clear HPLC chromatogram was obtained that showed the number and the relative activity for antioxidants.

研究分野：食品分析

キーワード：ORAC法 高速液体クロマトグラフィー(HPLC) 抗酸化物質 食品分析

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

活性酸素、フリーラジカルが発症の一因となるがんや動脈硬化をはじめとした種々の疾患の予防に、食品に含まれる抗酸化物質が重要な役割を果たすことが期待されている。抗酸化物質を豊富に含む食品を明らかにするため、食品の抗酸化能を試験管内で評価する *in vitro* 抗酸化能測定法が開発されてきた (表 1)。これら *in vitro* 抗酸化能測定法には、測定原理が異なる様々な方法があり、それぞれが長所・短所を有するが、基本的には食品から抗酸化物質を含む抽出液を作製し、この抽出液に含まれる抗酸化物質の活性をまとめて測定する方法である。この際、どのような抗酸化物質が抽出液に含まれているかは不明である。

抗酸化物質はその種類により化学物質としての抗酸化活性に差があるだけでなく、生体利用率にも差がある。そのため、食品に含まれる抗酸化物質の総量だけでなく、その種類に関する情報が大変重要であるが、上記のように一般の *in vitro* 抗酸化能測定法ではそれを知ることはできない。この問題を解決するために、古典的な *in vitro* 抗酸化能測定法である 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法や 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) 法については、HPLC と *in vitro* 抗酸化能評価法を組み合わせたオンライン HPLC-抗酸化能分析法が開発されている。オンライン抗酸化能分析法は HPLC で抽出液に含まれる抗酸化物質を分離した後、そのままポストカラムでその抗酸化能を測定する。クロマトグラム上における溶出時間は物質固有の数値となることから、標準品と一致すれば含有されている抗酸化物質の同定が可能であり、標準品が存在しない未知の抗酸化物質の存在についても知ることができる。

このように、オンライン HPLC-抗酸化能分析法は、食品に含まれる抗酸化物質の種類と活性に関する情報を同時に得ることができる強力な分析手法であり、HPLC システムに組み込むことで分析の全自動化が可能なることから簡便性にも優れる。しかし、研究開始当初、オンライン HPLC-抗酸化能分析法は古典的な DPPH 法及び ABTS 法に関してのみ応用されており、食品の抗酸化能評価法として汎用されている ORAC 法に関しては開発されていなかった。

表 1 代表的な *in vitro* 抗酸化能測定法とその特徴

名称	簡便性	測定機器	測定原理	生体との関連性
DPPH 法	簡便	吸光光度計	非天然のラジカルの消去	低い
ABTS 法	簡便	吸光光度計	非天然のラジカルの消去	低い
ORAC 法	少し煩雑	蛍光光度計	ペルオキシラジカルの消去	比較的高い
FRAP 法	簡便	吸光光度計	鉄イオンの還元	低い

出典 : J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 4290 - 4302 (一部抜粋して改変)

2. 研究の目的

ORAC 法は、生体内で発生するペルオキシラジカルを用いるという点で、古典的な DPPH 法及び ABTS 法より生体内抗酸化反応との関連性が高い結果が得られると考えられている。ORAC 法で検出される抗酸化物質は、測定原理が異なる DPPH 法及び ABTS 法で検出される抗酸化物質と異なるため、ORAC 法で測定された食品の抗酸化能に寄与する物質に関する情報を得るには、従来のオンライン HPLC-抗酸化能分析法の適用では不十分である。そこで、新たな ORAC 法を測定原理とするオンライン HPLC-抗酸化能評価法 (オンライン HPLC-ORAC 法) を開発するため、本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) オンライン HPLC-ORAC 法における分析条件の設定

ORAC 法の測定原理は、蛍光プローブである Fluorescein (FL) が 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) の熱分解により発生するラジカルにより蛍光を失う化学反応が、抗酸化物質の共存により阻害されることを利用している。オンライン HPLC-ORAC 法では、この反応を HPLC で食品抽出液に含まれる抗酸化物質を分離した後に反応

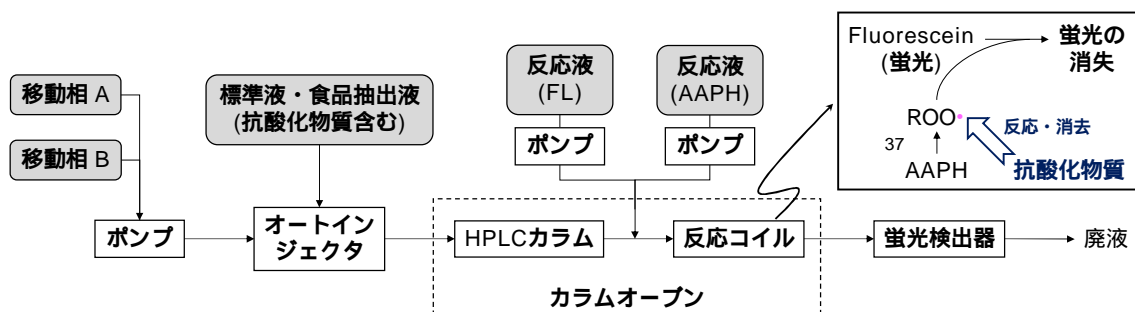


図1 HPLC-ORAC 法の概略図

コイル内で連続して行い、抗酸化物質を個別に検出可能とする (図 1)。FL と AAPH の不必要な反応を避けるため、FL を含む反応液と AAPH を含む反応液を個別に用意し、ポストカラム (HPLC 分離後) に溶離液に混和した。この際、溶離液中に HPLC で分離された抗酸化物質が含まれると、AAPH による FL の蛍光消滅が阻害され、蛍光のピークが検出される。

分析条件を最適化するため、まず HPLC カラムを系から外した状態で、100 µg/mL のアスコルビン酸水溶液を 0.5 µL 注入し、最も強く鋭敏なピークが得られるように、移動相の組成、反応液中の FL 及び AAPH の濃度、移動相及び反応液の流量、反応コイルの容量等を最適化した。次いで HPLC カラムを繋いで、抗酸化物質標準液 (アスコルビン酸、Trolox、クロロゲン酸、カフェ酸、カテキン; 各 100 µg/mL、30 %メタノール水溶液) を個別に分析し、これらが良好に分離する移動相のグラジエント条件を決定した。

(2) 単一試験室における妥当性確認試験：標準品混合液を用いた検討

50 %メタノール水溶液を用いて上記の 5 種類の抗酸化物質をそれぞれ 0.25 ~ 2.00 µg/mL 含む標準品混合液を調整した。決定した分析条件 (注入量は 10 µL) にて独立した実験を 3 回実施し、ピーク面積の濃度依存性、ピーク面積及び保持時間の繰り返し精度を明らかにした。

(3) 単一試験室における妥当性確認試験：緑茶カテキン抽出物を用いた検討

実サンプルへの適用性を確認するため、緑茶カテキン抽出物 (polyphenon 100; エピガロカテキンガレート含有量 66.6%、その他カテキン類 21.6 %) を 2.00 µg/mL の濃度で水に溶解し、10 µL を HPLC に注入した。

4. 研究成果

(1) オンライン HPLC-ORAC 法における分析条件

食品中の主要な抗酸化物質として知られるポリフェノール類を HPLC 分析する際は、汎用される逆相カラムへの保持を増加させるため、移動相に酸を添加することが多い。しかし、HPLC-ORAC 法にて重要となる FL の発する蛍光強度には pH 依存性があり、酸性度が高まるにつれて減弱する性質がある。そこでまず、移動相と反応液の組成を検討した結果、移動相に含む酸を酢酸 (0.1 %) とし、反応液を 75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で調整とすることで、FL の蛍光強度を維持できることが明らかとなった。次に、移動相の組成、反応液中の FL 及び AAPH の濃度、移動相及び反応液の流量、反応コイルの容量等を検討した。FL の濃度が高い場合 (1000 nM) には、送液ポンプの脈流に起因する等間隔のノイズが顕著に表れることから、FL の濃度を 100 nM とし、他の条件をそれに合わせて最適化した。最後に、極性が異なる 5 種類の抗酸化物質標準品に対して良好な分離が得られるよう水-メタノールを用いたグラジエント分析を検討した。メタノールは、微弱ではあるものの、濃度依存的に AAPH 由来のラジカルと反応する。そのため、メタノールの含有割合を最大 60 %とした。なお、水-アセトニトリルを用いたグラジエント系も検討したが、同様にアセトニトリルそのものが AAPH 由来のラジカルと反応した。これらの検討を経て決定した分析条件を表 2 に示す。

表 2 オンライン HPLC-ORAC 法の分析条件

カラム : InertSustain C18 (3 µm, 4.6 x 50 mm) + ガードカラム (4.0 x 10 mm)		反応溶液 A
移動相 : A = 水 (0.1 % 酢酸) B = メタノール (0.1 % 酢酸)		組成 : 100 nM Fluorescein 含有 75 mM リン酸緩衝液 (pH = 7.4)
グラジエント :		流速 : 0.25 mL/分
時間 (分)	B (%)	反応溶液 B
0	10	組成 : 25 mM Fluorescein 含有 75 mM リン酸緩衝液 (pH = 7.4)
10	60	流速 : 0.25 mL/分
15	60	反応コイル : 0.5 mm x 2 m (PEEK チューブ)
15.1	10	コイル温度 : 37
35	10	蛍光検出器 : 励起 485 nm、蛍光 528 nm
流速 : 0.5 mL/分		
温度 : 37		

(2) 単一試験室における妥当性確認試験：標準品混合液を用いた検討

図 2 に HPLC-ORAC 法で得られた典型的な標準品混合液のクロマトグラムを示す。5 種類の抗酸化物質に起因する明確なピークが観測された。カテキン、クロロゲン酸、カフェ酸についてはピークが近接しており、完全分離を達成することができなかった。この理由として、反応コイルにおける中のバンド拡散のため、ピークが保持時間と比してブロードとなってしまったことが考えられた。また、上述したように移動相中に含まれるメタノールそのものが抗酸化物質として作用するため、グラジエントによるメタノール含有量の増加に伴うベースラインの急激な上昇が認められた。さらに、Trolox の溶出位置と重なるシステムピークが認められた。

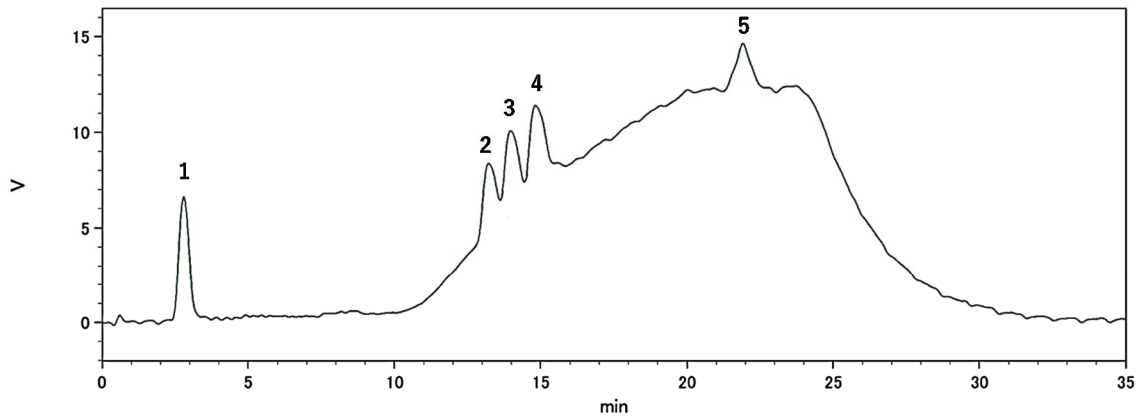


図2 抗酸化物質標準混合液の典型的なクロマトグラム

1=アスコルビン酸、2=カテキン、3=クロロゲン酸、4=カフェ酸、5=Trolox (一部システム由来のピークを含む)。各抗酸化物質の濃度は1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

図3に各抗酸化物質の濃度とピーク面積の関係を示した。いずれの標準品においても、0.25 ~ 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲において、濃度依存的にピーク面積が増加するが、その関係は直線にはならなかった。また、ピーク面積の相対標準偏差は1~31% (平均8%)であった。一方、ピーク保持時間の相対標準偏差は1%未満 (平均0.2%)であった。これらのことから、HPLC-ORAC法は、精密な定量分析には向かないものの、高い定性性を有することが示唆された。

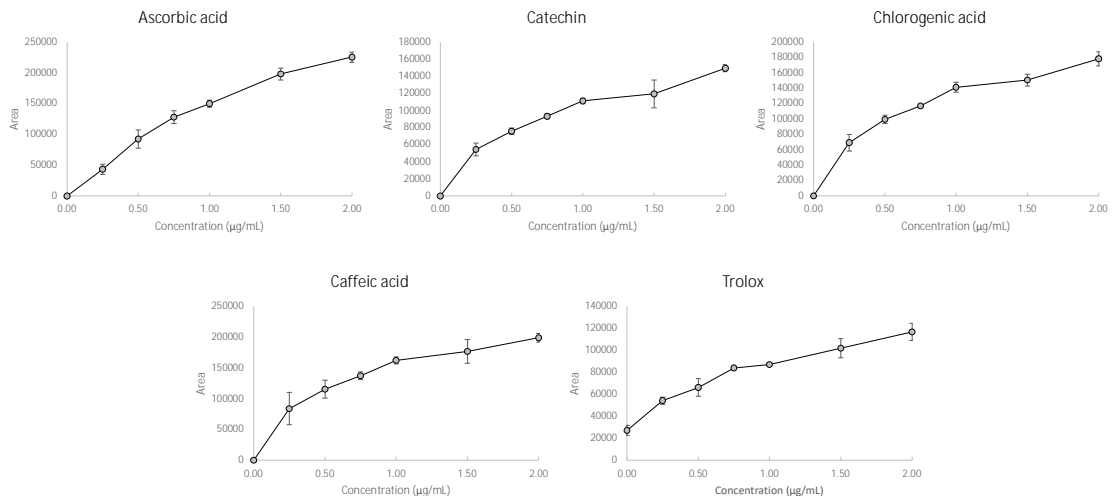


図3 抗酸化物質標準混合液の濃度とピーク面積の関係

平均値 \pm 標準偏差 (n=3) を示した。

(3) 単一試験室における妥当性確認試験：緑茶カテキン抽出物を用いた検討

図4にHPLC-ORAC法で得られた緑茶カテキン抽出物のクロマトグラムを示す。カテキンのピークの外、エピガロカテキンガレートと推定されるピークが観測された。

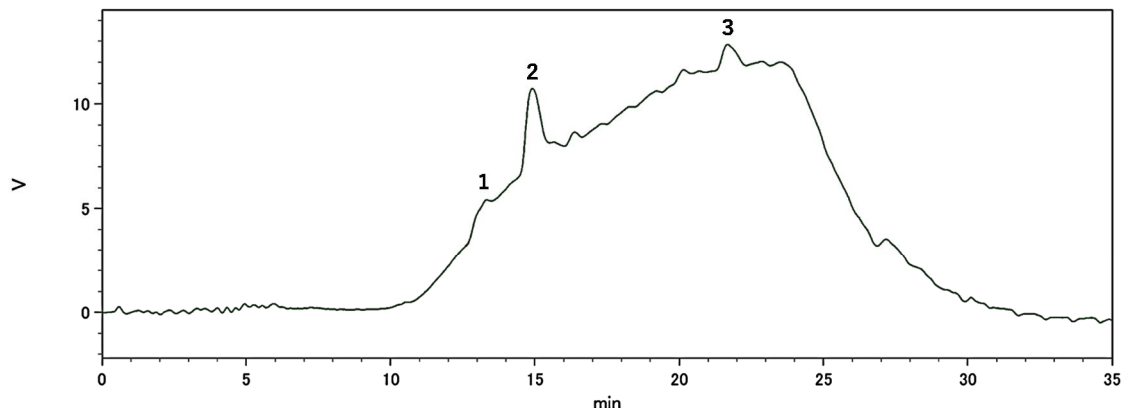


図4 緑茶カテキン抽出物の典型的なクロマトグラム

茶カテキン抽出物 (ポリフェノン100、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。1=カテキン、2=エピガロカテキンガレート、3=システムピーク。

(4) 今後の課題

本研究では、オンライン HPLC-ORAC 法を新規開発し、食品に含まれる既知及び未知の抗酸化物質に関する質（種類）及び量（活性）に関する情報を簡便かつ網羅的に取得することができることを示した。本法は、現時点では、正確な定量には向かないものの、高い定性性を有することが示唆された。今後の課題として以下の 2 点が挙げられる。

1 点目は、本法でモニターしている FL の蛍光強度が、pH や有機溶媒濃度のわずかな変動に鋭敏に反応するため、ベースラインノイズが大きくなっている点である。これは、低脈流型の送液ポンプを使用することによって、改善が期待できる。

2 点目は、メタノールやアセトニトリルといった逆相 HPLC で汎用される有機溶媒が微弱な抗酸化作用（AAPH 由来のラジカルとの反応性）を有するため、その使用濃度が 60 %以下に制限される点である。そのため、今回の分析条件では、Trolox より低極性の抗酸化物質はカラムから溶出せず、測定することができない。この問題は、ODS カラムより疎水性相互作用が弱い C8 カラム等を用いることによって、解決できると考えられる。

申請者らは、我が国において消費される代表的な野菜・果物等の ORAC 値を明らかにしており[~]、これらのデータは食品の有する抗酸化能が健康に及ぼす影響を明らかにするための疫学研究等に利用されている[~]。本研究で開発した HPLC-ORAC 法で得られる、含有抗酸化物の内訳に関する情報により、食品中の抗酸化物質の健康影響をより正確に評価することが可能となると期待される。

< 引用文献 >

Jun Takebayashi *et al.*, Estimated average daily intake of antioxidants from typical vegetables consumed in Japan: a preliminary study, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 2010, 2137-2140

Jun Takebayashi *et al.*, Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimated average daily intake of hydrophilic antioxidants from these foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 2013, 25-31

Jun Takebayashi *et al.*, Antioxidant capacities of plant-derived foods commonly consumed in Japan, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 66, 2020, 68-74

Satomi Kobayashi *et al.*, Dietary total antioxidant capacity from different assays in relation to serum C-reactive protein among young Japanese women, *Nutrition journal*, 11, 2012, 91

Megumi Tsubota-Utsugi *et al.*, The major source of antioxidants intake from typical diet among rural farmers in north-eastern Japan in the 1990s., *Journal of Epidemiology*, 2020, JE20190237

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 TAKEBAYASHI Jun、OKI Tomoyuki、TSUBOTA-UTSUGI Megumi、OHKUBO Takayoshi、WATANABE Jun	4. 巻 66
2. 論文標題 Antioxidant Capacities of Plant-Derived Foods Commonly Consumed in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 68～74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3177/jnsv.66.68	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsubota-Utsugi Megumi、Watanabe Jun、Takebayashi Jun、Oki Tomoyuki、Tsubono Yoshitaka、Ohkubo Takayoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 The Major Source of Antioxidants Intake From Typical Diet Among Rural Farmers in North-eastern Japan in the 1990s	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Epidemiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.2188/jea.JE20190237	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oki Tomoyuki、Sato-Furukawa Maki、Watanabe Jun、Takebayashi Jun、Ogata Naoki	4. 巻 64
2. 論文標題 Oxygen Radical Absorbance Capacity and Tocopherol Content in Pressed Oils Made from Sesame (<i>Sesamum indicum </i>L.) Cultivar “Maruhime” and Rapeseed (<i>Brassica napus </i>L.) Cultivar “Nanaharuka”	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi	6. 最初と最後の頁 464～470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3136/nskkk.64.464	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----