

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05937

研究課題名(和文) HPLC-ESR分析法による含着色成分青果物の高抗酸化活性物質の探索と機能評価

研究課題名(英文) HPLC-ESR investigation to explore potent superoxide radical inhibitor involved in vegetables, fruits and beverages

研究代表者

田嶋 邦彦 (Tajima, Kunihiko)

愛媛大学・農学研究科・研究員

研究者番号：50163457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HPLCと流通型ESR装置を融合したHPLC-ESR装置を開発し、カラム溶出物質のスーパーオキシドラジカル(以下、SOR)消去活性をESRクロマトグラムとして観測した。ESRクロマトグラムの定量的な解析からカラム溶出物のSOR消去活性評価するために基準物質としてコーヒー酸(CA)を選択した。本研究ではESRクロマトグラムをCA換算濃度([CAeq.])に変換し、その面積強度から各成分のSOR消去活性を数値化する手法を確立した。HPLC-ESR法を青果物、果汁および飲料に応用することで、主要なSOR消去活性物質の寄与を定量的な評価が実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、優れたスーパーオキシドラジカル(以下、SOR)消去活性を備えた青果物、果汁および飲料の積極的な摂取が健康維持に寄与することが広く認知され、SOR消去活性を指標とする青果物および関連食品の開発が続けられている。従来のSOR消去活性評価法では、青果物水溶性成分のSOR消去活性を混合物の状態で計測しているため、主要成分の濃度と活性については不明であった。本研究で確立したHPLC-ESR分析法では、青果物に含まれる主要成分をカラム分離し、それらのSOR消去活性のオンライン分析が可能であり、我が国の食品機能評価の分野への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The flow-spin-trapping ESR system combined with the HPLC apparatus (HPLC-ESR) enabled the observation of the ESR chromatograms of column eluates by post-column on-line ST-ESR detection of the DMPO/O₂ radical. The current study demonstrates that the intensity and line shape of ESR chromatograms are dominated by SOR scavenging ability and concentration of antioxidants. Furthermore, the total SOR radical scavenging activities of the column-eluted fractions are accurately quantified using the equivalent concentration of caffeic acid ([CAeq.]). HPLC-ESR systems that allow visualization of SOR scavenging functions of column eluates are advantageous for exploring potential SOR scavengers contained in plant-derived water extracts. For example, HPLC-ESR analyses clarified that the most useful SOR scavenging active substances involved in coffee were chlorogenic acid derivatives and these contribution to the total SOR scavenging activity of coffee brew reached about 75%.

研究分野：食品物理化学

キーワード：スーパーオキシドラジカル HPLC-ESR 電子スピン共鳴 抗酸化活性

1. 研究開始当初の背景

本研究は、HPLC と流通型 ESR 装置を融合した HPLC-ESR 装置を使用して、カラム溶出成分のスーパーオキシドラジカル（以下、SOR）消去化活性をオンライン分析する定量解析法の確立を目指した。HPLC-ESR 装置では、SOR と DMPO のスピントラッピング反応で生じる DMPO/O₂ ラジカル濃度の時間変化を ESR クロマトグラムとして記録する。DMPO/O₂ ラジカルの濃度は SOR に対する DMPO と抗酸化物質の競争反応によって減少するため、その線形解析からカラム溶出成分の SOR 消去活性の評価が可能である。研究開始当初は、既知物質の ESR クロマトグラムの面積強度と SOR 消去活性に十分な相関性が認められた。その後の研究で、ESR クロマトグラムの面積強度はカラム溶出成分の活性と濃度だけでなく、溶出時間の増加に依存して拡大する特性を有することが判明した。この予期しない問題を解決するために、本研究では、ESR クロマトグラムを基準物質の濃度変化曲線に換算し、その面積強度を評価する新規解析法の妥当性を検討した。研究期間内に、SOR 消去活性に適切な基準物質を選定するだけでなく、HPLC-ESR 分析法をコーヒーに応用し、その定量的な解析から主要な SOR 消去活性物質の同定と活性を評価する。

2. 研究の目的

近年、優れた SOR 消去活性を備えた青果物、果汁および飲料の積極的な摂取が健康維持に寄与することが広く認知されてきた。そのため、SOR 消去活性を指標とする青果物の改良および関連食品の開発が続けられている。これまで、既存の SOR 消去活性法によって青果物水溶性成分の総 SOR 消去活性が計測され、活性の比較との序列化が研究されてきた。一般に、青果物の水溶性成分には遷移金属イオン、低分子量および高分子量有機物など少なくとも数百種の成分が含まれている。特に、銅、鉄およびマンガンイオンは素早く SOR を消去するため、総 SOR 消去化活性に顕著な影響を及ぼす。したがって、青果物の SOR 消去活性を解釈するには、遷移金属イオンと有機成分を分離して活性を評価する必要がある。

本研究で取り扱う HPLC-ESR 法は、青果物水溶性成分に含まれる低分子量有機成分の SOR 消去活性を遷移金属イオンと分離して計測できる唯一の分析法である。本研究の目的は、ESR クロマトグラムからカラム溶出成分の SOR 消去活性を基準物質の換算濃度として数値化法の確立である。さらに、本研究では HPLC-ESR 法をコーヒーに含まれる SOR 消去活性物質の同定と活性評価に応用する。

3. 研究の手法

HPLC-ESR で観測する ESR クロマトグラムの線形を反応速度論に基づいて再現するために、等濃度のコーヒー酸(CA)とクロロゲン酸(CGA)の水溶液を基準試料として HPLC-ESR 測定を実施した。HPLC カラムから溶出する CA および CGA の吸光度を両者のモル吸光係数から濃度の時間変化曲線($[CA]_t$ および $[CGA]_t$)に換算した。次に、式 1 および 2 によって、CA および CGA の ESR クロマトグラム($^{CA}Y_t$ および $^{CGA}Y_t$)の速度論的なシミュ

レーションを試みた。両者の ID₅₀ 値を最適化(^{CA}ID₅₀=3.1 ± 0.1 μM および ^{CGA}ID₅₀=4.0 ± 0.2 μM)して得た計算結果は、実測の SER クロマトグラムと良好に一致した。また、ID₅₀ 値の逆数の比較から、CA の SOR 消去活性は CGA の 1.2 倍上回ることが判明した。

$${}^{\text{CA}}Y_t = 1 - 1 / (1 + [\text{CA}]_t / {}^{\text{CA}}\text{ID}_{50}) \quad \text{式 1}$$

$${}^{\text{CGA}}Y_t = 1 - 1 / (1 + [\text{CGA}]_t / {}^{\text{CGA}}\text{ID}_{50}) \quad \text{式 2}$$

次に、CA および CGA の ESR クロマトグラムの面積強度(^{CA}S および ^{CGA}S)を区分求積法によって解析したところ、CGA の面積強度が CA を約 1.4 倍上回る(^{CA}S < ^{CGA}S)結果が得られた。これは ESR クロマトグラムの面積強度は必ずしも SOR 消去活性と一致しないことを示唆している。そこで、CA を SOR の基準物質として ESR クロマトグラムを CA 換算濃度の時間変化([CAeq.]_t)への変換した(式 3)。次に、ガウス関数を仮定して[CAeq.]_t をシミュレーションし、その面積強度をカラム溶出成分の SOR 消去活性として評価した(^{CA}[CAeq.]_{total} および ^{CGA}[CAeq.]_{total})。両者の比率(^{CA}[CAeq.]_{total}/^{CGA}[CAeq.]_{total} = 1.2)は ID₅₀ の比率(^{CA}ID₅₀/^{CGA}ID₅₀=1.2)とほぼ一致した。この結果から、CA を基準物質とする ESR クロマトグラムの面積強度解析法はカラム溶出成分の SOR 消去活性を正確に数値化できる手法であることが支持された。

$$[\text{CAeq.}]_t = (1 / Y_t - 1) {}^{\text{CA}}\text{ID}_{50} \quad \text{式 3}$$

4. 研究成果

(1) HPLC-ESR の構成と動作原理と測定試料； Figure 1-a に示したように、HPLC-ESR¹⁾ システムではカラムの下流においてリボフラビン(Rf)の光還元反応による SOR ラジカルの生成と DMPO によるスピントラッピング ESR 検出を実現する。²⁾ DMPO/O₂ ラジカルの ESR 信号(Figure 1-b)は窒素核および 2 個の非等価なプロトンによる微細分裂を示す。³⁾ Figure 1-c のシミュレーション結果は実測のスペクトルを良好に再現しており、その面積強度から本システムで定常的に生成する DMPO/O₂ ラジカルの濃度を 1.3 ± 0.2 μM と評価した。DMPO/O₂ ラジカルのピーク位置に ESR の外部磁場を固定した時間掃引 ESR 測定によって DMPO/O₂ ラジカルの濃度変化を ESR クロマトグラムとして記録した。¹⁾ 本研究の HPLC-ESR 測定では DMPO、Rf および EDTA の最終濃度を 19.2 mM, 2.3 μM, and 5.8 mM に設定し、標準試料(CA および CGA)の濃度を 250 μM とした。¹⁾ コーヒーはコロンビア産アラビカ種の粉末をペーパーフィルターで抽出し、限外濾過で高分子量成分(HMW > 10000)と低分子量成分(LMW)に分離し、それぞれを凍結乾燥して粉末試料を調製した。

(2) 基準物質(CA および CGA)の ESR クロマトグラム解析結果； HPLC-ESR の流通系に CA および CGA の等濃度混合溶液(250 μM)のリン酸緩衝液(pH7.4, 20 μL)を注入し、UV

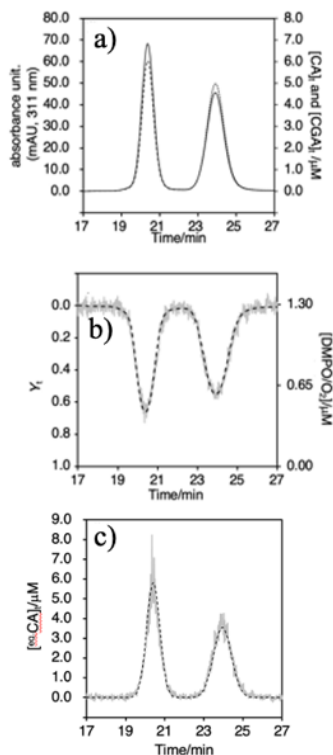


Figure 2; a) 実線はCA(20.4 min) CGA (23.4 min)のUVクロマトグラム、破線は $[CA]_t$ および $[CGA]_t$ 、b) 実線はESRクロマトグラム、破線は計算結果、c) 実線は $[CAeq.]_t$ 、破線は計算線結果

クロマトグラム(275 および 311 nm)を観測した(Figure 2-a)。⁴⁾ CA および CGA はそれぞれ 20.4 および 23.4 min に溶出し、両試料のモル吸光係数から吸光度を濃度($[CA]_t$ 、 $[CGA]_t$)に換算した(Figure 2-a)。⁵⁾ $[CA]_t$ および $[CGA]_t$ の面積強度から算出した両者の総モル数はカラムに注入した試料溶液と一致した(250 μ M, 20 μ L)。CA と CGA の混合溶液の ESR クロマトグラム(Y_t)には、それぞれの溶出ピークが観測された(Figure 2-b)。式 1 および 2 を使用してシミュレーションした ESR クロマトグラムの線形は実測結果と良好に一致し、CA と CGA の ID_{50} をそれぞれ $3.1 \pm 0.1 \mu$ M および $4.0 \pm 0.2 \mu$ M と評価した。次に、CA を基準物質として、その $^{CA}ID_{50}$ (3.1μ M)を用いて ESR クロマトグラム($^{CA}Y_t$ および $^{CGA}Y_t$)を CA 換算濃度の時間変化($[CAeq.]_t$)に換算した(Figure 2-c)。⁶⁾ さらに、両者の $[CAeq.]_t$ をガウス線形でシミュレーション後に面積強度を算出し、流通系に注入した試料溶液の体積(20 μ L)で濃度に換算した($^{CA}[CAeq.]_{total} = 249.2 \mu$ M、 $^{CGA}[CAeq.]_{total} = 211.3 \mu$ M)。両者の比率($^{CA}[CAeq.]_{total} / ^{CGA}[CAeq.]_{total} = 1.2$)は ID_{50} の比率($^{CA}ID_{50} / ^{CGA}ID_{50} = 1.2$)とほぼ一致した。ESR クロマトグラムから求めた $[CAeq.]_{total}$ はカラム溶出物質の SOR 除去活性を反映する解析値であることが支持された。

(3) コーヒーの ESR クロマトグラムの CA 換算濃度；

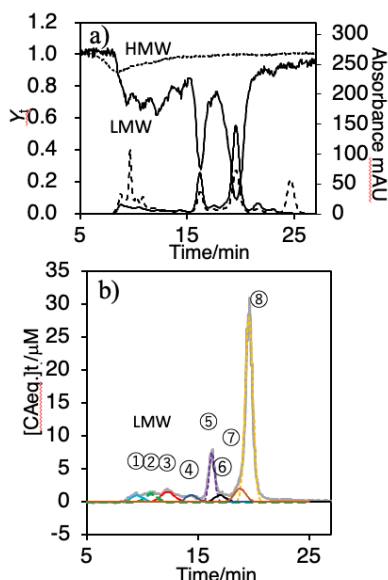


Figure 3; a) ESRおよびUVクロマトグラム(実線はLMW、破線はHMW)、b) LMWの $[CAeq.]_t$

コーヒーの低分子量成分(LMW, 重量比 96%)と高分子量成分(HMW, 重量比 4%)の ESR クロマトグラムを測定した(Figure 4-a)。HMW には 7.4 min に弱いピークが認められ、その後は緩やかに減衰した。LMW には多数のピークが観測され、なかでも強い 16.3 および 19.6 min のピークが特徴的である。ESR クロマトグラムの溶出時間と 330 nm の UV クロマトグラムに類似性が認められ、16.3 および 19.6 min の溶出ピークは、溶出時間からクロロゲン酸の構造異性体(5-および 3-クロロゲン酸)と帰属した。他方、275 nm で観測した UV クロマトグラムの 24 min のピークには対応する ESR クロマトグラムのピークは認められない。溶出時間からこの強いピーク (24 min) をコーヒーに含まれるカフェインとして帰属した。

Figure 4-b に示したように、LMW の ESR クロマトグ

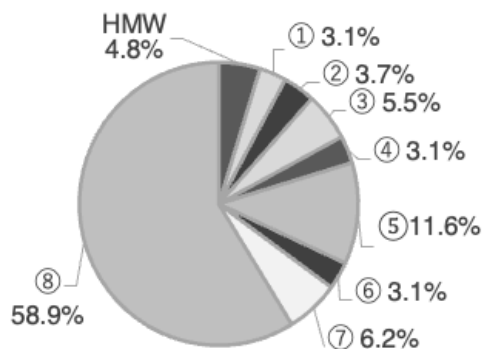


Figure 4; コーヒーのSOR消去活性に寄与するHMWおよび成分①～⑧の比抗酸化活性；総SOR消去活性([CAeq.]^{total})は729 μ M

ラムから式 3 を用いて換算した[CAeq.]_t にはピーク①～⑧が認められた。すべてのピークをガウス線形で近似し、重ね合わせることで実測の[CAeq.]_t が良好に再現できた(Figure 4-b)。次に、各ピークの面積強度を算出し、それらの総和としてLMWのSOR消去活性([CAeq.]^{total})を693 μ Mと解析した。他方、HMWのESRクロマトグラムを[CAeq.]_t に換算し、その面積強度から[CAeq.]^{total}を36 μ Mと評価した。コーヒーの総SOR消去活性をHMWとLMW成分のSOR消去活性の和として、CA換算濃度で729 μ Mと評価した。

コーヒーの総SOR消去活性に対するHMWおよび成分①～⑧の寄与を比抗酸化活性(%)として円グラフに示した(Figure 4)。まず、コーヒーに含まれる主要なSOR消去活性成分はピーク⑤と⑧のクロロゲン酸異性体であり、両者の寄与の合計は約70%に達する。その他の成分①～④および⑥～⑦の詳細な構造は不明であるが、330 nmに吸光度を有することから、コーヒー酸のエステル誘導体として推定している。他方、HMWはコーヒー豆の焙煎過程で生じる褐色のメイラード反応生成物として予想され、その比SOR消去活性は僅か5%であった。以上の結果から、HPLC-ESR分析法は、コーヒーのSOR消去活性に寄与する主要成分の探索とそれらの比SOR消去活性について詳細な知見を提供する分析法として結論した。今後は、HPLC-ESR分析法を青果物、果汁および飲料に応用し、SOR消去活性を指標とする高機能食品の開発に資する知見を蓄積したい。

<参考文献>

- 1) Y. Sakurai, T. Yamaguchi, A. Nakajima, K. Kanaori, and K. Tajima, *Chem. Lett.*, **2014**, *43*, 527-529.
- 2) Y. Sakurai, K. Kawai, R. K.-Watanabe, C. Morimoto, S. Sakamoto, A. Nakajima, K. Kanaori, K. Tajima, *Chem. Lett.*, **2009**, *38*, 662-663.
- 3) E. Finkelstein, G. M. Rosen, and E. J. Rauckman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 4994-4999; G. R. Buettner, *Free Radic. Res.*, **1990**, *10*, 11-15.
- 4) カラムはゲル濾過カラム(TS3000PW, TOSO)を使用した。このカラムは高塩濃度条件下(リン酸緩衝溶液 50 mM)でフェノール化合物を吸着で分離する。
- 5) M. P. Raghavendra, P. R. Kumar, V. Prakash, *J. Food Sci.*, **2007**, *72*, E412-E419.
- 6) Y. Sakurai, S. Yamaguchi, N. Yamamoto, T. Yamashita, Y. Lu, K. Kuwabara, T. Yamaguchi, Y. Miyake, K. Kanaori, and K. Tajima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2020**, *93*, 730-744.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kuwabara, Keiko; Nishio, Natsuki; Nakano, Ryota; Sakurai, Yasuhiro; Yamaguchi, Tomoko; Miyake, Yusuke; Kanaori, Kenji; Tajima, Kunihiko	4. 巻 51
2. 論文標題 Stopped-flow-optical Absorption and -ESR Detection of Rutin (Quercetin-3-O-rutinoside) B-ring Catechol Aroxyl Radicals Generated during Redox Reaction between Rutin and superoxide Radical in DMSO	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 431-434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.220009	査読の有無 有
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 Watanabe, Seiyaa, Murase, Yohsukea; Watanab, Yasunori, Sakurai, Yasuhiro; Tajima, Kunihiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Watanabe, Seiyaa, b, cSend mail to Watanabe S.; Murase, Yohsukea; Watanabe, Yasunoria, b, d; Sakurai, Yasuhiro; Tajima, Kunihikoe	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology0	6. 最初と最後の頁 681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02147-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakurai, Yasuhiro, Yamamoto, Naoko; Yabuta, Yuki; Kanaori, Kenji; Tajima, Kunihiko	4. 巻 50
2. 論文標題 Flow spin-trapping esr detection of OH and H radicals derived from helium atmospheric-pressure plasma at gasliquid interface employing a micro open-flow reactor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1628 - 1631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210282	査読の有無 有
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 Ohmura, Toshimichia; Morimasa, Yohei; Ichino, Tomoya; Miyake, Yusuke; Murata, Yasujiro; Suginome, Michinori; Tajima, Kunihiko; Taketsugu, Tetsuya, Maeda, Satoshi,	4. 巻 90
2. 論文標題 Mechanism of 2,6-dichloro-4,4'-bipyridine-catalyzed diboration of pyrazines involving a bipyridine-stabilized boryl radical	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of Chemical Society Japan	6. 最初と最後の頁 1894-1902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20210145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 K. Kuwabara, R. Nakano., Y. Sakurai, T. Yamaguchi, Y. Miyake, K. Kanaori, K. Tajima	4. 巻 49
2. 論文標題 Stopped-flow-optical absorption and -electron spin resonance studies on short-lived quercetin semiquinone radical produced by redox reactions with superoxide radical in DMSO	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry letters	6. 最初と最後の頁 260-263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190898	査読の有無 有
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 Y. Sakurai, S. Yamaguchi, N. Yamamoto, T. Yamashita, Y. Lu, K. Kuwabara, T. Yamaguchi, Y. Miyake, K. Kanaori, K. Tajima	4. 巻 93
2. 論文標題 Development of flow-injection spin-trapping esr methods for kinetic study of the superoxide radical scavenging reaction with mixtures of phenolic antioxidants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 730-744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200046	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Eui Kyoung Jang, Yohei Koikeb Yuko Ide, Kunihiko Tajima, Kenji Kanaori and Seung Pil Pack	4. 巻 56
2. 論文標題 Nucleobase-involved native chemical ligation: a novel reaction between an oxanine nucleobase and N-terminal cysteine for oligonucleotide-peptide conjugation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5508-5511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9cc08808c	査読の有無 有
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 該当する

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------