

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580166

研究課題名(和文)新規HPLC-ESR装置による食品成分の活性酸素消去活性のオンライン評価

研究課題名(英文) Application of a new HPLC-ESR system for water soluble components of foods and vegetables

研究代表者

田嶋 邦彦 (Tajima, Kunihiko)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：50163457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：青果物の水溶性成分(Ws)にはタンパク質、核酸、糖質、脂質、アミノ酸、遷移金属および代謝物が含まれ、それらが個々の2次反応速度定数[ki]と濃度[Aoxi]で活性酸素種(ROS)と並列的に反応する。本研究では、02-8226;の測定対象とするHPLC-ESR法で青果物Wsに含まれる抗酸化活性物質を詳細に検討し、主要な抗酸化活性成分の帰属およびそれらの総活性に対する寄与(比抗酸化活性)の解析し、20種類の青果物に含まれる抗酸化物質の比活性を申請者が開発したHPLC-ESR法によって数値化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Recently, flow-injection ESR systems for the quantitative spin-trapping ESR measurements have been developed to estimate the second order rate constants (ks) of the reaction between hydroxyl radical and scavengers. The flow-ESR technique is employed for development of a new HPLC-ESR system for the post-column screening of superoxide radical scavengers. This system was composed of a flow UV-irradiation cell for photo-excitation of riboflavin (Rf) to generate superoxide radical in the presence of an appropriate electron donor such as EDTA. The HPLC-ESR analysis was performed for water soluble components derived from 20 vegetables, such as onion, spinach, cabbage, root radish, etc.

研究分野：物理化学・磁気共鳴分光学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：スーパーオキシドラジカル 抗酸化活性 青果物水溶性成分 HPLC-ESR分析法

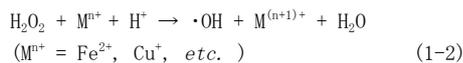
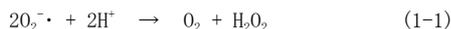
1. 研究開始当初の背景

食品機能として活性酸素ラジカル (ROS) を無毒化する抗酸化活性が注目されている。食品の ROS 抗酸化活性とはスーパーオキシドおよびヒドロキシルラジカルを、それぞれ過酸化水素 (OOH) および水に還元する反応速度定数に相当する。短寿命化学種である ROS は分光学的な検出が困難なために、現在でも食品成分との反応解析は立ち後れている。さらに、多数の抗酸化成分が混在する食品の抗酸化活性を評価するには、少なくとも主要な食品成分を分離した後に、それらの抗酸化活性を解析する計測技術が必要である。本研究では新規開発した ROS を測定対象とする流通型電子スピン共鳴 (ESR) を既存の HPLC 装置と融合した HPLC-ESR システムを開発し、カラムから溶出する食品成分ごとの ROS 抗酸化活性をポストカラム-オンライン評価する。本研究の当初の目的は、HPLC-ESR システムで食品成分の ROS 除去活性を計測、解析および評価する方法論を確立し、食品の由来、製造法あるいは保存条件が食品の抗酸化活性に及ぼす影響を明らかにすることである。さらに、本システムの信頼性が向上した時点で、青果物の水溶性成分などを実試料としてスーパーオキシドラジカル除去活性物質の探索を行う。

2. 研究の目的

生体系で普遍的に生成する ROS ( $O_2^-$ 、 $\cdot OOH$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ ) はタンパク質、核酸および脂質などを無秩序に酸化する。これは、ガンや炎症などの様々な疾病を誘発することから、ROS の生成と消失反応の機構が化学、生化学および医学の領域で精力的に研究されている。たとえば、酸素分子の 1 電子還元体である  $O_2^-$  は、呼吸鎖の電子伝達系から副産するだけで無く、NADPH 酸化酵素、キサンチン酸化酵素などの反応過程でも生成する。他方、 $O_2^-$  の消失反応には Cu(II) イオンを反応中心に有するスーパーオキシドラジカル不均化酵素 (SOD) が寄与し、 $O_2^-$  は過酸化水素と酸素分子に不均化される。この反応で生成する過酸化水素は、フェントン反応と総称される遷移金属イオンとの酸化還元反応で  $\cdot OH$  を生成するため、過酸化水素は生体系における主要な  $\cdot OH$  の生成源として考えられている。 $\cdot OH$  は有機分子と  $10^6 \sim 10^{10} M^{-1} s^{-1}$  の拡散律速に近い反応速度で反応するため、生体系に  $\cdot OH$  を選択的に消去する物質は存在しない。しかし、生体系には  $\cdot OH$  の生成源である過酸化水素を素早く消去する酵素群が存在している。活性中心にヘムを有するカタラーゼは高原子価鉄錯体を経て過酸化水素を酸素分子と水に代謝する。このように、生体系で生成した ROS が速やかに代謝、分解する反応は抗酸化反応と総称される。

SOD



これまでに、ROS と生体関連物質の抗酸化反応の機構は分光学的な手法によって反応速度論的に研究されてきた。特に基本的な生体関連物質と  $\cdot OH$  の 2 次反応速度定数は 1960 年以降にパルスラジオリシス法 (PR 法) によって精力的に研究されている。電子スピン共鳴法 (ESR) は常磁性である  $O_2^-$  を選択的かつ高感度検出できる唯一の分光法である。室温で  $O_2^-$  を検出する方法としてスピントラッピング ESR 法 (spin-trapping ESR, ST-ESR) がある。ST-ESR 法は短寿命ラジカル ( $X\cdot$ ) がニトロソ ( $R-N=O$ ) あるいはニترون ( $R-C=N-O$ ) 基を有するスピントラッピング試薬 (ST 試薬) の窒素あるいは炭素原子に付加して生じるニトロキシドラジカル ( $N-O\cdot$ ) の ESR 信号を検出する手法である (式 1-3 および 4)。ST 反応で生成する  $N-O\cdot$  はスピニアダクトと呼ばれ、その寿命は室温で数十秒から数十分程度に達するために高分解な ESR 信号の観測が可能である。スピニアダクトの ESR スペクトルから得られた電子-核微細結合定数 (hyperfine coupling constant; hfcc) から ST 試薬に付加した短寿命ラジカル種が帰属できる。

$O_2^-$  の ESR 検出に最も多用されている ST 試薬が 5 員環ニترون化合物の DMPO (5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) である (図 1-2)。DMPO が  $O_2^-$  を捕捉して得られるスピニアダクト (DMPO/ $O_2^-$ ) は等強度の 12 本線 ( $a^N = 1.41$  mT,  $a^{H\beta} = 1.14$  mT,  $a^{H\alpha} = 0.123$  mT) を与える。他方、DMPO と  $\cdot OH$  の反応で生成するスピニアダクト (DMPO/ $\cdot OH$ ) の ESR スペクトルは強度比 1 : 2 : 2 : 1 ( $a^N = a^H = 1.49$  mT) の 4 本線であり、DMPO/ $O_2^-$  と完全に区別して観測できる (図 1-2)。いずれのスピニアダクトも市販の標準的な ESR 装置によって検出できるため、DMPO は化学反応系や細胞系などで生成する ROS の検出と同定に多用されている。その後、 $O_2^-$  と DMPO の 2 次反応速度定数 (式 1-3) が  ${}^0k_1 = 2.4 M^{-1} s^{-1}$  と評価された。1995 年以降、ST-ESR 法は  $\cdot OH$  および  $O_2^-$  と抗酸化物質 (Aox) の反応速度定数の評価法として注目された。

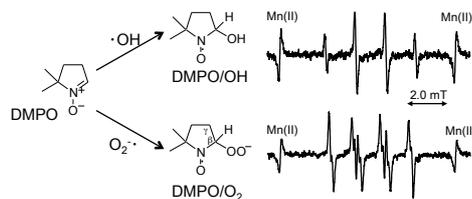
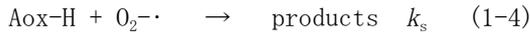


図1-2 DMPOとヒドロキシル( $\cdot OH$ )およびスーパーオキシドラジカル( $O_2^-$ )のスピントラッピング反応およびDMPO/OHとDMPO/ $O_2^-$ ラジカルのESRスペクトル。



$$k_s = k_1 [\text{DMPO}] / {}^{\text{O}_2}\text{ID}_{50} = k_1 \times \gamma_{50} \quad (1-5)$$

$$\gamma_{50} = [\text{DMPO}] / {}^{\text{O}_2}\text{ID}_{50}$$

本研究では、青果物や食品に含まれる  $\text{O}_2\cdot^-$  に対する優れた抗酸化活性物質を探索するために、HPLC カラムの下流で  $\text{O}_2\cdot^-$  を ST-ESR 検出する HPLC-ESR 装置を開発し、 $\text{O}_2\cdot^-$  との反応速度定数が既知のフェノール性物質（没食子酸； gallic acid、コーヒー酸； caffeic acid および 4 ヒドロキシ桂皮酸； 4-hydroxycinnamic acid）を等しい濃度で混合した試料溶液の ESR-クロマトグラムを記録した。さらに、得られた ESR クロマトグラムのガウス線形によるフィッティングを試みた。その結果、ESR-クロマトグラムのピーク高さおよび面積は、溶出成分の反応速度定数と濃度に依存することを明らかにした。これらの結果は HPLC-ESR 装置が食品や飲料あるいは青果物の水溶性成分に含まれる  $\text{O}_2\cdot^-$  消去活性物質の探索に適した機能を有することが支持された。

### 3. 研究の方法

図 2-7 は HPLC-ESR 装置の構成図である。この装置は HPLC カラムの下流で  $\text{O}_2\cdot^-$  の生成に必要な試薬 (Rf と EDTA) および DMPO を混合するためのミキサーと送液ポンプで構成されている。HPLC 分析システムは、送液ポンプ 1 (TOSOH, DP-8020)、インジェクションバルブ、カラムオーブン (TOSOH, CO-8020)、カラム (TOSOH, TSK-gel G3000 PW)、HPLC 紫外可視吸光検出器 (TOSOH, UV-8020) で構成されている。このポンプ 1 は 1.0 mL/min で PB 溶液 (pH 7.4、50 mM) を連続的に送液している。カラムの下流に接続した流通型 3 液混合攪拌型ミキサー (資生堂, inner volume, 100 $\mu$ L) には 2 台のシリンジ駆動ポンプ (HARVARD, HPD3000) にセットされた 2 本のガスタイトシリンジ (Hamilton, gastight syringe, 1010TLL) A および B が接続されている。シリンジ A は DMPO (1.05 M) と EDTA (52.5 mM) の PB 溶液 (pH 7.4 50 mM) を、シリンジ B は Rf (125.0  $\mu$ M) の PB 溶液 (pH 7.4、50 mM) をそれぞれ 0.01 mL/min および 0.04 mL/min の流速でミキサーに供給し、その下流における送液量の総和は 1.05 mL/min である。この装置では、流通型光照射セルにおける DMPO、EDTA および Rf の終濃度はそれぞれ 10.0 mM、0.5  $\mu$ M および 4.8  $\mu$ M である。光照射セルを混合溶液が通過する時間、つまり、ST 反応の反応時間は約 2.3 秒である。また、光照射装置から ESR 扁平セルに溶液が到達するために要する時間は 0.7 秒である。

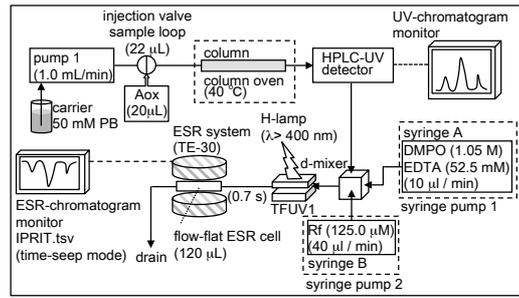


図2-7 HPLC-ESR装置の構成図。  
PB; リン酸バッファー、f-mixer; フィルター型ミキサー、d-mixer; 攪拌型ミキサー、TFUV1; 流通型光照射セル。

### 4. 研究成果

#### ① HPLC-ESR 装置の基本的な性質と特性

HPLC-ESR 装置はカラム溶出成分の  $\text{O}_2\cdot^-$  消去活性を DMPO/ $\text{O}_2$  の濃度変化として記録し、得られた ESR-クロマトグラムの強度から高活性成分を探索する。HPLC-ESR 装置のゼロレベル補正を実例として、本装置の動作原理および安定性について述べる。上図の HPLC-ESR 装置の 3 系統の送液ポンプを連続的に運転した状態で ESR 装置の磁場を掃引すると、

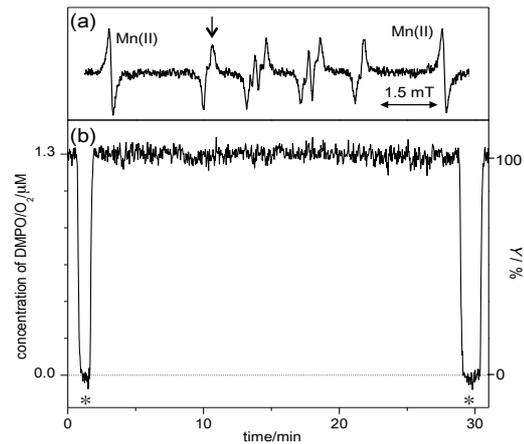


図2-8 HPLC-ESR装置で観測したDMPO/ $\text{O}_2$ のESRスペクトルとESR-クロマトグラム。  
(a) DMPO/ $\text{O}_2$ のESRスペクトル。図中の↓にESR装置の外部磁場を固定してESR-クロマトグラムを記録した。  
(b) ESR-クロマトグラム。図中の\*は可視光照射を停止して記録したDMPO/ $\text{O}_2$ のESR信号強度のゼロレベル。流通型光照射セルにおけるDMPO、RfおよびEDTAの終濃度はそれぞれ10.0 mM、4.8  $\mu$ Mおよび0.5 mM。

図 4-1-a に示す DMPO/ $\text{O}_2$  の ESR 信号が検出できる。TEMPOL を標準試料とする ESR 強度の定量的解析から、DMPO/ $\text{O}_2$  の濃度は約 1.3  $\mu$ M と解析された。次に、DMPO/ $\text{O}_2$  の ESR スペクトルのピーク位置 (↓) に ESR 装置の外部磁場を固定し、先の  ${}^{\text{O}_2}\text{FI-ESR}$  法と同様の条件で時間掃引 ESR 測定を行った (図 2-8-a)。ここで、DMPO/ $\text{O}_2$  の濃度がゼロになる水準を規定するために、流通型光照射セルへの可視光照射を約 60 秒間停止した。すると、DMPO/ $\text{O}_2$  の濃度は急速に低下し、ゼロレベルに到達した。再び、可視光照射を再開すると DMPO/ $\text{O}_2$  の濃度は急速に上昇し、光照射停止前の水準に到達した。さらに、ESR-クロマトグラムを記録開始後約 30 分後に可視光照射の停止と再開を行うと、先の結果と同様の DMPO/ $\text{O}_2$  の濃度の

急速な低下と増加が観測された。これらの結果から、可視光照射を停止して達する水準は DMP0/O<sub>2</sub> の濃度がゼロ、つまりゼロレベル(\*)であることを支持している。また、約 30 分後に同様の信号が得られたことは、この間に ESR 装置の感度あるいは DMP0/O<sub>2</sub> の生成条件がほぼ一定に保たれたことを支持している。ここで、約 30 分間の測定時間内に認められた ESR-クロマトグラムのシグナルノイズ比 (S/N) は 12、変動幅は±7.5%である。ESR-クロマトグラムの信号強度は、DMP0/O<sub>2</sub> の濃度あるいは消去率 (Y%) で表記した。

## ② 既知物質の混合溶液の HPLC-ESR 分析

図 5-1 は、GA、CA および 4CA の等濃度 (25 μM) の混合溶液 (20 μL) をインジェクションバルブから注入して得た UV-クロマトグラム (275 nm の吸光度) および ESR-クロマトグラム (DMP0/O<sub>2</sub> の濃度) である。EUV-クロマトグラムに観測された 3 本の溶出ピークは、それぞれの溶出時間 (RT) から GA (11.4 min)、CA (17.3min) および 4CA (18.5 min) と帰属できた。

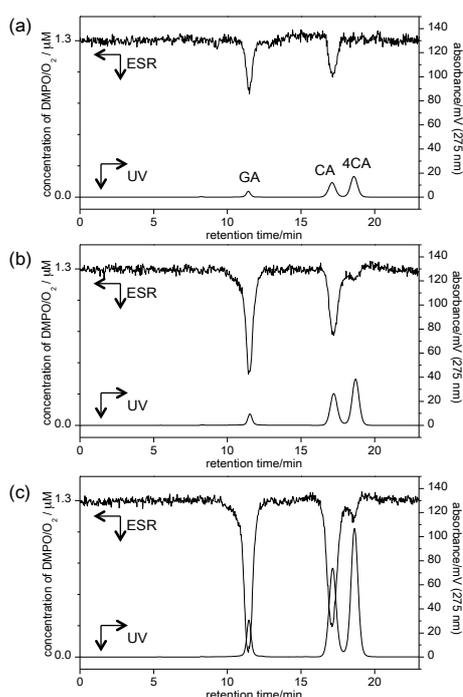


図5-1 HPLC-ESR装置で観測したGA、CAおよび4CAの等濃度混合溶液のUVおよびESR-クロマトグラム。  
(a) 25 μMの混合溶液、(b) 50 μMの混合溶液および(c) 150 μMの混合溶液。  
HPLC-ESR測定におけるDMP0、RfおよびEDTAの終濃度はそれぞれ10.0 mM、4.8 μMおよび0.5 mMであり、GA、CAおよび4CAの等濃度PB溶液(20 μL)を分析試料とした。

このように、低分子量フェノール誘導体を分離できることが本カラムの特性である。溶出曲線を積分することで、カラムから溶出したGA、CA および 4CA のモル数を  $4.0 \times 10^{-10}$  mol、 $4.6 \times 10^{-10}$  mol および  $4.7 \times 10^{-10}$  mol として評価した。溶出成分のモル数はカラムに注入した各成分のモル数 ( $5.0 \times 10^{-10}$  mol) と 20%以内で一致した。また、GA、CA および 4CA の溶出曲線におけるピークの濃度 (P<sub>c</sub>)

は、それぞれ 0.6、0.6 および 1.1 μM と解析した。ここで、ピーク濃度が一致しないのは GA、CA および 4CA 溶出曲線の線幅が異なるからである。同様の測定と解析を異なる濃度の混合試料溶液 (50 μM、150 μM) について行い、いずれの場合にも良好な一致を認めた。

## ③ クロマトグラムのガウス線形近似解析法

HPLC-ESR 装置は未知のカラム溶出成分の ESR-クロマトグラムを観測し、その成分の O<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去活性を評価することを目的としている。未知成分の ESR-クロマトグラムから、その O<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去活性と濃度に関する情報を獲得する試みとして、CA を標準試料とする溶出曲線のガウス線形 (G(t)、式 5-1) 近似による解析を試みた。ここで、CA を標準試料に採用したのは、CA と O<sub>2</sub><sup>-</sup> の 2 次反応速度定数 (<sup>02</sup>k<sub>c</sub>) が既知であるからである。たとえば、GA の濃度が 25 μM で得られた ESR-クロマトグラム (図 4-1-a) のピーク消去率 (<sup>GA</sup>Y<sub>p</sub>) は 67% であり、この <sup>GA</sup>Y<sub>p</sub> に等しい消去率を達成する CA 濃度 (CA 換算ピーク濃度、P<sub>CAEq</sub>) は先に述べた CA の <sup>02</sup>ID<sub>50</sub> 値 (<sup>02</sup>ID<sub>50</sub><sup>CA</sup> = 1.8 μM) を用いて式 (5-3) から 0.93 μM と求められる。

$$G(t) = Y_p \times \exp \{-\ln 2 \times (t - t_p)^2 / (d_e/2)^2\} \quad (5-2)$$

t ; retention time

t<sub>p</sub> ; ESR-クロマトグラムのピーク時間

d<sub>e</sub> ; ESR-クロマトグラムの半値幅

$${}^{\text{GA}}Y_p = 100 \times 1 / \{1 + P_{\text{CAEq}} / {}^{\text{02}}\text{ID}_{50}^{\text{CA}}\} \quad (5-3)$$

次に、GA の ESR-クロマトグラム線形を P<sub>CAEq</sub> の時間変化曲線と見なして、その線形をガウス関数 (式 5-2、Y<sub>p</sub> = P<sub>CAEq</sub>) で近似した。実際に、GA の ESR-クロマトグラムは、P<sub>CAEq</sub> を 0.93 μM とするガウス関数 (半値幅 (d<sub>e</sub>) が 31 秒) による近似曲線と線と良好な一致が認められた (図 5-3)。

ガウス関数近似で得た ESR-クロマトグラムを時間 t で積分すると、溶出曲線に含まれる CA 換算モル数 (CA<sub>Eq</sub>) が求められる。実際に、GA の ESR-クロマトグラムの面積強度から CA<sub>Eq</sub> は  $4.5 \times 10^{-10}$  mol として解析された。同様にして、CA の ESR-クロマトグラムは P<sub>CAEq</sub> を 0.64 μM とするガウス曲線 (半値幅 (d<sub>e</sub>) が 40 秒) と良好に一致し、面積強度から CA 換算モル数は  $4.2 \times 10^{-10}$  mol と求められた。この値は CA の UV-クロマトグラムから求めたこの CA の物質質量 ( $4.6 \times 10^{-10}$  mol) と良く一致している。同様の解析法で、50 および 150 μM の GA、CA および 4CA 含む混合試料の ESR-クロマトグラムをガウス線形近似すると、実測の線形と良好に一致するシミュレーション結果が得られた (図 5-3-b、-c)。

このようなガウス線形による解析法では溶出成分の濃度が不明であっても、CA 換算モル数 (CA<sub>Eq</sub>) として表現することが可能である。ここで、2 つの溶出曲線の CA<sub>Eq</sub> の和を混合溶液が有する総抗酸化活性 (CA<sub>Eq</sub><sup>total</sup>) と仮定し、その比率として各溶出成分の比抗

酸化活性 ( $R_{Aox} = CA_{Eq} / CA_{Eq}^{total}$ ) を定義した。これまでに、混合系試料の各成分の比抗酸化活性 ( $R_{Aox}$ ) を評価した研究例は無く、HPLC-ESR 分析法は食品や飲料等の抗酸化活性を詳細に研究する上で有用な分析手法であると結論できる。

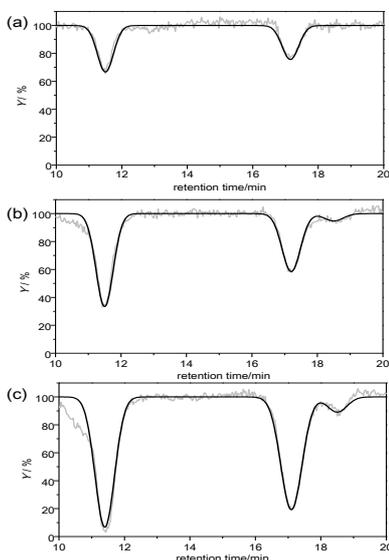


図5-3 HPLC-ESR装置で観測したGA、CAおよび4CAの等濃度混合溶液のUVおよびESR-クロマトグラムとガウス線形近似によるシミュレーション。  
(a) 25  $\mu$ Mの混合溶液、(b) 50  $\mu$ Mの混合溶液および(c) 150  $\mu$ Mの混合溶液。  
太線はESR-クロマトグラムのシミュレーション結果。  
HPLC-ESR測定は図5-1と同条件で観測した。

#### ④ 結論

混合系試料に含まれる優れた  $O_2\cdot$  消去活性物質を探索する方法論として、HPLC カラムの下流で  $O_2\cdot$  の ST-ESR 信号をオンライン検出する HPLC-ESR 装置を開発した。得られた ESR-クロマトグラフの溶出曲線の線形はカラム溶出成分の  $O_2\cdot$  消去活性および濃度に依存して変化することを明らかにした。濃度既知の標準試料溶液に対する HPLC-ESR 分析の結果から、本法は多成分系の混合試料である食品や飲料の抗酸化活性を理解するだけでなく、それらに含まれる優れた  $O_2\cdot$  消去活性物質を探索するためにも有用な分析手法であることを明らかにした。

#### 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 8 件)

- 1) Sakurai, Y., Nakajima, A., Kanaori, K., Tajima, K., Development of Flow-injection Spin-trapping ESR System for Estimation of Second Order Rate Constants for Reactions of a Superoxide Anion Radical and Selected Phenolic Compounds, 査読有り、Chemistry Letters, No. 4, 2014, pp. 527-529.
- 2) Kawai, K., Sakurai, Y., Komatsu, R., Morimoto, C., Nakajima, A., Kanaori, K., Tajima, K., Application of Flow-ESR Techniques for Mechanistic Study of

Biological Radical Reactions: HPLC-ESR Spin-Trapping System for Post-Column Evaluation of the Superoxide Radical Scavenging Activity of Column Eluates, 査読有り、Applied Magnetic Resonance, Vol. 40, No. 4, 2011, 449-458.

他 6 件

〔学会発表〕 (計 12 件)

- 1) 服部玄、山口智子、田中宏治、櫻井康博、徳田尚美、田嶋邦彦、青果物におけるフリーラジカル消去活性評価および成分分析、第 60 回食品科学工学会、実践女子大学、2013、8 月 30 日  
他 11 件

〔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 (計 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

田嶋 邦彦 (TAJIMA KUNIHICO)

京都市芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：50163457

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：