

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850089

研究課題名(和文)新規流通系ESR法による青果物に含まれる脂溶性成分の活性酸素消去評価法の構築

研究課題名(英文)Online evaluation of superoxide radical scavenging activity of vegetables fat-soluble components as studied by HPLC-ESR spin-trapping measurements

研究代表者

山口 智子(YAMAGUCHI, Tomoko)

京都工芸繊維大学・ベンチャーラボラトリー・研究員

研究者番号：90644914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食品などの混合成分の抗酸化活性を分析するためにHPLC-ESRシステムを構築した。このシステムはHPLCカラムで分離した成分の濃度に関する情報を光吸収スペクトルで得るとともにESRシステムにより溶出成分の抗酸化活性をオンライン分析で評価することができる。また、ESRクロマトグラムのピーク強度と面積強度は、カラム溶出成分のスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性および濃度に依存することから、青果物および食品などの混合系試料の抗酸化活性評価とそれに含まれる高活性成分の探索が可能となる。この装置を用いて測定したESRクロマトグラムの線形シミュレーションにより抗酸化活性の定量評価法の確立を行った。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have developed flow-injection-ESR and HPLC-ESR systems special for quantitative spin-trapping ESR detection of the superoxide radical by using DMPO, as a spin-trapping reagent. The flow-ESR techniques were employed to explore potent superoxide radical scavengers involved in foods. In the present study, HPLC-ESR measurements were made for water-soluble components of foods. The determination of antioxidant activity was calculated using ESR line simulation.

研究分野：分析化学

キーワード：流通系ESR HPLC-ESR 抗酸化活性 スーパーオキシドアニオンラジカル コーヒー酸換算値 FI-ESR  
青果物 ガウス線形シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

近年、食品中の ROS 除去活性を系統的に数値化する研究が行われている<sup>1)</sup>。ROS 除去活性の数値化は、ROS モデルラジカルとして安定ラジカルとして観測する DPPH 法<sup>2)</sup>とスーパーオキシドアニオンラジカル(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)とヒドロキシルラジカル(•OH)を測定対象とする ESR 法による方法がある。ESR 法では、•OH と O<sub>2</sub><sup>•-</sup> を区別して検出できるスピントラッピング法が応用されている。しかし、ESR 法は乏しい定量性と再現性が原因で、食品の ROS 除去活性法として認識されていない。

ROS のスピントラッピング ESR 法に特化した流通型 ESR 法が開発されたことで、食品成分の ROS 除去活性成分の評価法として確立されつつある。食品成分は混合成分であるために、成分を分離し各成分の抗酸化活性の評価が必要である。我々は青果物中の抗酸化活性を評価するために HPLC 分析装置と ESR 装置を融合した HPLC-ESR 装置を新規に開発した<sup>3)</sup>。

2. 研究の目的

HPLC 分析装置と ESR 装置を融合した HPLC-ESR 装置を開発し、この装置を用いて、青果物に含まれる水溶性および脂溶性成分の抗酸化活性成分を探索し、高活性成分の分子構造を NMR および質量分析を用いて明らかにする。また、得られた ESR クロマトグラムの線形、ピーク強度および面積強度を速度論的に解析する。

3. 研究の方法

菜の花の可食部を 3 倍量の超純水と共にミキサーで粉砕した。酵素を失活するために 80℃で 30 分間加温処理後に残渣を濾別して菜の花の水溶性成分を調製した。他の青果物についても同様の方法で水溶性成分を得た。この水溶性成分を凍結乾燥後、リン酸緩衝液(pH 7.4)を加えて測定に用いた。HPLC-ESR の測定サンプルには、1ml (50 mM PB, pH 7.4)になるように調製した。HPLC 分析には GPC カラム (TOSOH, G3000PW) を使用し、カラム溶出液の光吸収スペクトルを PDA 分光器で記録した。HPLC および FI-ESR システムは X-band ESR 分光器 (TE-30, JEOL) と HPLC システム (Shimadzu LC-10AT) で構成され、流通系における O<sub>2</sub><sup>•-</sup> の生成反応にはリボフラビン(Rf)の光還元反応を採用した<sup>4)</sup>。

4. 研究成果

我々は青果物などの水溶性成分の抗酸化活性を評価するために、スーパーオキシドラジカルの定量的な検出に適した流通型 ESR 法を研究してきました。HPLC カラムの溶出成分の O<sub>2</sub><sup>•-</sup> 除去活性をオンライン分析する HPLC-ESR システムを構築した。Fig.1 に示すように本システムは、HPLC カラムで分離した成分の濃度に関する情報を光吸収スペクトルで得るとともに、ESR システムにより

溶出成分の抗酸化活性をオンライン分析を行うことが可能である。

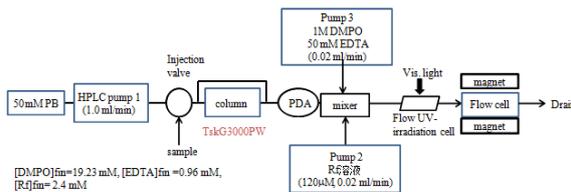


Fig.1, HPLC-ESR システム図

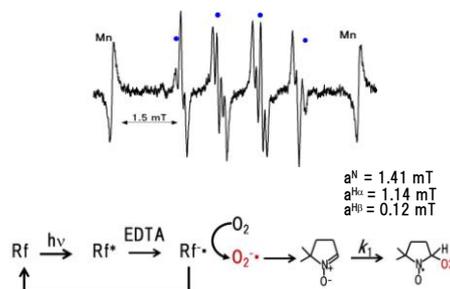
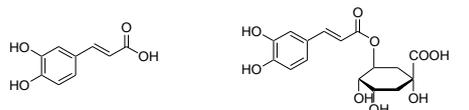


Fig. 2, DMPO/O<sub>2</sub> の ESR スペクトル

HPLC ポンプは、FI システムのキャリアー溶液であるリン酸緩衝溶液 (50 mM PB, pH 7.4) を供給する。HPLC のカラムは、GPC カラム(東ソー, TskG3000PW)であり、ポリフェノール類に関して親和力が高く、植物由来のフェノール系物質の分離に適している<sup>5)</sup>。カラム溶出液は、紫外・可視吸収セルを経由して、ST (スピントラッピング) のミキサーに流入する。他のポンプから、DMPO および EDTA の混合溶液をミキサーに供給した。カラム成分と ST 試薬の混合液は、流通系照射セルを通過する間に DMPO/O<sub>2</sub> ラジカルを生成し、ESR ユニットに到達する。このセルの流路を反応溶液が通過する 2 秒間で生成した O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ラジカルは DMPO に補足されて、0.7 秒以内に ESR 扁平セルに到達する。Fig.2 は、DMPO/O<sub>2</sub> ラジカルの ESR スペクトルである。窒素核 (I=1) による 3 本分裂がさらに 2 個の水素核で分裂した等強度の 12 本線の微細分裂が観測された<sup>6)</sup>。このピーク位置に外部磁場を固定して、時間変化 ESR を記録するとカラム溶出成分の活性と濃度を反映する ESR クロマトグラムが得られる。HPLC-ESR システムのカラムと光吸収モニターをバイパスすると FI-ESR 装置となり、インジェクションバルブから注入した試料の抗酸化活性に応じて DMPO/O<sub>2</sub> の濃度が減少し、その減少率が 50 %に達する抗酸化物質の濃度(ID<sub>50</sub>)が評価できる。本研究では HPLC-ESR 分析を青果物の成分の抗酸化活性評価に応用するために、その基礎研究として ESR クロマトグラムの線形、ピーク強度および面積強度等を速度論的に解析し、その結果を基に実試料の ESR クロマトグラムの解析を試みた。

今回の研究では、 $O_2^{\cdot -}$  の 2 次反応速度定数 (ks)<sup>3)</sup> および、ID<sub>50</sub> 値等が既知であるコーヒン酸(CA)とクロロゲン酸 (CGA)を基準物質とした。



Caffeic acid (CA)	Chlorogenic acid (CGA)
$CAk_s = 1.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$CGAk_s = 7.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
ID <sub>50</sub> = 2.8 ± 0.2 μM	ID <sub>50</sub> = 3.4 ± 0.1 μM
RT = 20.4 min	RT = 23.8 min

Fig.3, 2 種類の標準試料

CA および CGA を 0.25 mM ずつ混合した試料を mixture1 とし、0.13 mM ずつ混合した溶液を mixture2 とした。

mixture1 と 2 の総抗酸化活性は、CA および CGA の ID<sub>50</sub> 値から、式 1 より算出した。

$$[CA]_{eq, MIX} = [CA]_0 + [CGA]_0 \times ID_{50} M(CA) / ID_{50} M(CGA) \dots (1)$$

Mixture 1 の加成則から得られた値は 460 μM, FI-ESR から求めた値は 421 μM, mixture 2 はそれぞれ 229 μM, 210 μM となり、加成則から求めた CA 換算値と FI-ESR から求めた混合溶液の CA 換算値は 10 % の誤差範囲で一致した。

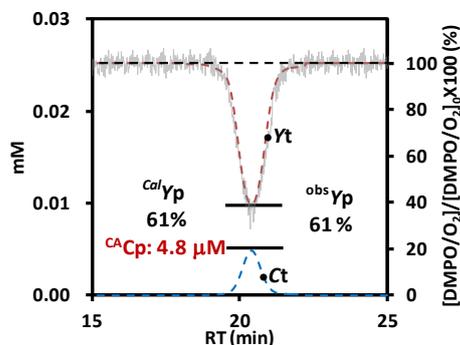


Fig. 4, 競争反応に基づくシミュレーション (CA 0.25 mM)

Fig. 4 は CA を 0.25mM に調製した溶液をカラムにロードして得られた HPLC-ESR クロマトグラムである。上に凸の曲線が CA の濃度に換算した溶出曲線である。CA の溶出曲線のピーク濃度と CA の ID<sub>50</sub> 値から式 2 より、ESR クロマトグラムのピーク消去率の計算値 (calYp) は、61% と算出され、これは実測の obsYp (61%) と良好に一致しました。

$$Cal Y_t = 100 \cdot [100 / (1 + [C_t] / ID_{50})] \dots (2)$$

ESR クロマトグラムの線形は、スーパーオキシドラジカルに対する DMPO と抗酸化物質の競争反応を反映していることが確かめられました。

次に、この ESR クロマトグラフを濃度と ID<sub>50</sub> 値が未知の溶出成分と見立てて、その定量的な解析を試みた。まず、CA を基準物質

として、式 3 より、その ID<sub>50</sub> 値と ESR クロマトグラフのピーク消去率 obsYp から、ピークにおける CA 換算濃度 (pCAeq) を求めます。

$$cal Y_p = 100 \cdot [100 / (1 + [CA]_p \text{ eq.} / ID_{50})] \dots (3)$$

$$cal Y_p = obs Y_p \times \exp(-\ln(2) \cdot (t - tr)^2 / \tau^2) \dots (4)$$

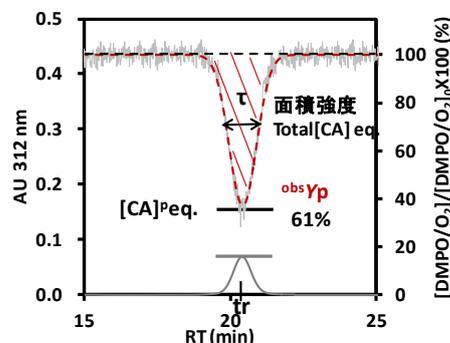


Fig. 5, ガウス線形シミュレーション (CA 0.25 mM)

次に、式 4 より (t) を適化してガウス線形として ESR クロマトグラフを再現すると、赤色破線のように良い一致が得られた。さらにガウス曲線を積分すると、ESR クロマトグラムに寄与した抗酸化物質の総量を CA 換算濃度として数値できる。この解析方法であれば、ESR クロマトグラムのピーク強度と面積強度から、カラム溶出成分の抗酸化活性を CA 換算濃度として数値化できることが分かった。

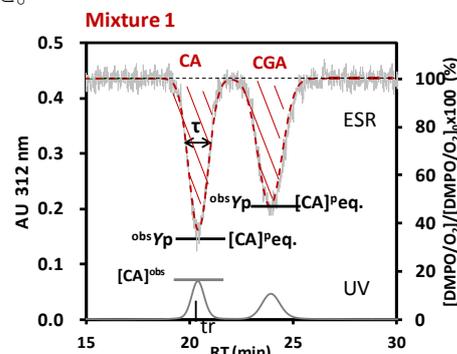


Fig. 6, ガウス線形シミュレーション (CA, CGA 0.25 mM)

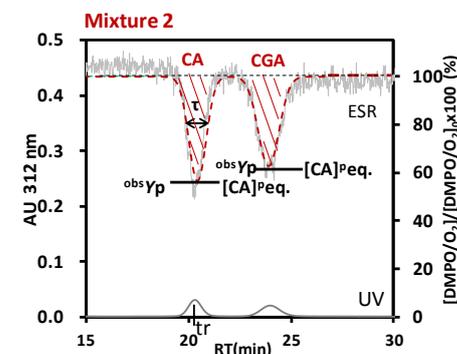


Fig. 7, ガウス線形シミュレーション (CA, CGA 0.13 mM)

次に混合系試料でのガウス線形シミュレーションを行った。Fig. 6 および Fig. 7 より、CA と CGA の等モル混合試料 Mixture1 と 2 の ESR クロマトグラムには溶出時間 20.4 および 23.8 分に CA と CGA の ESR クロマトグラムが観測され、CGA に比べて抗酸化活性が高い CA の方が、ESR クロマトグラムのピーク強度  $Y_p$  が高いことが明らかになった。CA と CGA のピーク強度から、それぞれの CA 換算濃度を 4.8、3.2  $\mu\text{M}$  と求め、ガウス線形でフッティングすると、これらの破線のシミュレーション線形が得られ、その積分強度から、CA 換算濃度を求めた。さらに、それらの和として、mixture1 および 2 の抗酸化活性の総和を CA 換算濃度として、それぞれ 418 および 199  $\mu\text{M}$  と算出しました。mixture1 と 2 の抗酸化活性を FI-ESR で評価して求めた CA 換算濃度は、それぞれ、412 および 210  $\mu\text{M}$  であり、ESR クロマトの実験値と良好一致が認められた。この結果は、ESR クロマトグラムの強度解析から未知試料の抗酸化活性を CA 換算濃度として評価できることを支持している。

Table 1. 混合系試料の ESR クロマトグラムのガウス線形シミュレーション結果

Compound	Mixture 1		Mixture 2	
	CA	CGA	CA	CGA
Concentration (mM)	0.25	0.25	0.13	0.13
Peak $Y_p$ (%)	61±4.2	53±4.2	46±4.0	36±4.0
Peak [CA]eq. ( $\mu\text{M}$ )	4.8	3.2	2.2	1.7
[CA]eq. ( $\mu\text{M}$ )	228	190	98	101
Total [CA]eq. ( $\mu\text{M}$ )	418		199	
Total [CA]eq. ( $\mu\text{M}$ )	421		210	

菜の花の水溶性成分の HPLC-ESR 測定結果を Fig. 8 示した。菜の花の UV クロマトグラムには 10.7, 13.5, 16.6, 21.3 分に主要なピークが観測された。ESR クロマトグラムには 8.7, 10.7, 11.4, 13.5, 19.4 分に主要な抗酸化活性が認められた。

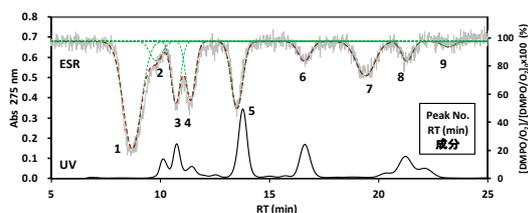


Fig. 8. 菜の花の水溶性成分の HPLC-ESR クロマトグラム

これは、ESR クロマトグラムのピークと UV クロマトグラムが一致しないのは  $\text{O}_2\cdot^-$  を消去する物質は限定的であることを意味している。ESR クロマトグラムの面積強度をコーヒー酸換算値 (CAeq.)として数値化したところ、各ピークの CAeq.はそれぞれ 164, 26, 27, 29, 21  $\mu\text{M}$  であり、8.7 分および 13.5 分に溶出する成分が菜の花の抗酸化活性に大きく寄与していることがわかった。抗酸化活性成分を分取後に NMR を測定したところ、10.7 分はアスコルビン酸 (ACS)、13.4 分は Tyr などのアミノ

酸、19.7 分はフラボノイド誘導体が含まれていることが明らかになった。ピーク 1 は分取後に 77-K ESR を測定した結果、遷移金属イオンが含有していることが分かった。ESR 線形シミュレーションの総和を求めたところ 290  $\mu\text{M}$  となり、FI-ESR 法で求めた混合試料の抗酸化活性と良好に一致しました。また、総抗酸化活性と各ピークの活性の比から、各成分の比抗酸化活性がこのように解析できた。

Table 2. 菜の花の水抽出溶液に含まれる主要な抗酸化活性成分の  $\text{O}_2\cdot^-$  消去活性評価

Peak No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total [CA]eq. ( $\mu\text{M}$ ) HPLC-ESR	Total [CA]eq. ( $\mu\text{M}$ ) FI-ESR
RT (min)	8.7	9.8	10.7	11.4	13.5	16.6	19.4	21.3	23.2	---	---
$Y_p$ (%)	79	21	49	47	47	16	23	15	3	---	---
[CA]eq. ( $\mu\text{M}$ )	164	8	26	27	29	8	21	6	2	290	298
比活性 (%)	57	3	9	9	10	2	7	2	1	---	---

次に他の青果物についても HPLC-ESR を測定し、ESR クロマトグラムをガウス線形でシミュレーションし、CAeq.としてまとめた (Fig. 9)。

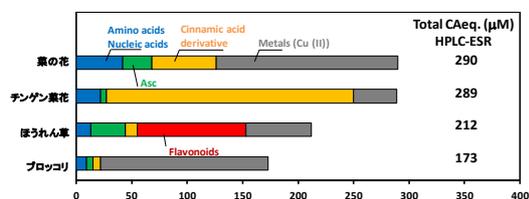


Fig. 9. 青果物水溶性成分に含まれる抗酸化活性成分の内訳

菜の花の HPLC-ESR 測定結果から、metal の活性が大きく、チンゲン菜花は metal よりも桂皮酸骨格を有する成分の関与が大きいことが判明した。ほうれん草には、フラボノイド類が含まれていることが明らかになっており、それら活性が大部分をしめていることが分かった。ブロッコリはフラボノイドでも桂皮酸でもなく metal が活性に寄与していることが明らかになった。HPLC-ESR より求めた CAeq.と FI-ESR から求めた CAeq.が良好に一致していることが明らかになった。ESR クロマトグラムをガウス線形でシミュレーションをすることで、未知試料の抗酸化活性物質の定量的評価が可能になりました。

これまでに、青果物等の水溶性成分の抗酸化活性について、主要な抗酸化活性成分の寄与を定量的に評価した研究例は無く、HPLC-ESR 法の応用研究が期待できる。

#### <引用文献>

- ① 末石 芳巳, 食品中の抗酸化物質がもつ様々な活性ラジカル消去能の評価法の構築, 浦上財団研究報告, 18, 2011, 59-65.
- ② 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, 新本洋士, 農作物のラジカル消去能の検索, 日本食品科学工学誌, 49, 257-266, 2002.

- ③ Y. Sakurai, T. Yamaguchi, A. Nakajima, K. Kanaori, and K. Tajima, Development of a Flow-injection Spin-trapping ESR for Estimation of Second-order Rate Constants for Reactions of a Superoxide Anion Radical and Selected Phenolic compound, *Compounds, Chem. Lett.* 43, 2014 527-529.
- ④ R. Watanabe, Y. Sakurai, C. Morimoto, S. Sakamoto, K. Kanaori, and K. Tajima, Quantitative Spin-trapping ESR Investigation on Reaction of Hydroxyl Radical and Selected Scavengers by a Newly Developed Flow-injection ESR System *Chem Lett.*, 37, 2008, 612-613.
- ⑤ E.K. Bekedam, H.A. Schols, M.A.J.S. van Boekel, and G. Smit, High Molecular Weight Melanoidins from Coffee Brew, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2006, 7658-7666.
- ⑥ G.R. Buettner, Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts 1474 1528 V, *Free Radical Biol Med.*, 1987, 3, 259.
- ⑦ E. Ahle, S. Raynaud-LeGrandic, R. Ralainirina, S. Baltoro-Rosset, F. Mesnard, C. Prouillet, J. Maziere, M. Fliniaux, Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure, *Food Chem.*, 2004, 86, 579-585.

#### 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 3 件)

- ① Akira Nakajima, Tomoyuki Yamashita, Tomoko Yamaguchi, Kiyoshi Kawai, Yusuke Miyake, Kenji Kanaori, and Kunihiko Tajima, Application of a Flow-injection Spin-trapping ESR Method for Evaluating the Alkoxy Radical Elimination Capacity (AREC) of Selected Antioxidants, *Chemistry Letters*, 査読有, 150121, 2015, DOI: 10.1246/cl.150121
- ② Akira Nakajima, Tomoko Yamaguchi, Tomoyuki Yamashita, Kiyoshi Kawai, Yusuke Miyake, Kanaori Kenji, Kunihiko Tajima, Quantitative Spin-trapping ESR Investigation of Alkoxy Radical Derived from AAPH: Development of a Flow-injection Spin-trapping ESR system for the Oxygen Radical Absorbance Capacity

Assay, *Applied Magnetic Resonance*, 査読有, 46, 2015, 1-10.

DOI: 10.1007/s00723-015-0664-5

- ③ Yasuhiro Sakurai, Tomoko Yamaguchi, Akira Nakajima, Kenji Kanaori, and Kunihiko Tajima, Development of a Flow-injection Spin-trapping ESR for Estimation of Second-order Rate Constants for Reactions of a Superoxide Anion Radical and Selected Phenolic Compounds, *Chemistry letter*, 査読有, 43, 2014, 527-529, DOI: 10.1246/cl.150121

[学会発表] (計 7 件)

- ① 山口智子, 田中宏治, 三宅祐輔, 金折賢二, 田嶋邦彦, HPLC-ESR 法によるカラム溶出成分の  $O_2^{\cdot -}$  消去活性評価方法, 日本化学会 第 95 春季年会, 2015 年 3 月 29 日 日本大学 理工学部船橋キャンパス (千葉県)
- ② Tomoko Yamaguchi, Gen Httori, Kenji Kanaori, Kunihiko Tajima, Isamu Tachimoto, Superoxide radical scavenging activity of cooked rice as studied by HPLC-ESR spin-trapping measurements, APES-IES-SEST 2014, 2014 年 11 月 14 日, Toudaiji culture center (奈良県)
- ③ 山口智子, 服部 玄, 金折 賢二, 田嶋 邦彦, 舘本 勲武, HPLC-ESR 法による炊飯米の水溶性成分の  $O_2^{\cdot -}$  消去活性評価, 61 回日本食品科学工学会, 2014 年 8 月 29 日, 中村学園大学 (福岡市)
- ④ 山口智子, 服部玄, 金折賢二, 田嶋邦彦, 舘本勲武, HPLC-ESR 法による炊飯米水溶性成分の  $O_2^{\cdot -}$  消去活性評価, 第 18 回 ESR フォーラム, 2014 年 7 月 26 日, 名古屋大学シンポジオン会議室 (名古屋市)
- ⑤ 田嶋邦彦, 山口智子, 田中宏治, 櫻井康博, 金折賢二, 服部玄, 流通系 ESR 法による青果物水溶性成分のスーパーオキシドラジカル消去活性の解析, 第 52 回電子スピンスイエンズ学会, 2013 年 10 月 24 日, 大宮ソニックシティ (埼玉市)
- ⑥ 服部玄, 山口智子, 田中宏治, 櫻井康博, 徳田尚美, 田嶋邦彦, 丹羽真澄, 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評価, 第 60 回記念大会, 日本食品科学工学会, 2013 年 8 月 30 日, 実践女子大学 (東京都)
- ⑦ 山口智子, 田中宏治, 櫻井康博, 金折賢二, 田嶋邦彦, HPLC-ESR 法によるタケノコの水溶性成分に含まれる  $O_2^{\cdot -}$  消去活性物質の探索と活性評価, 第 17 回 ESR フォーラム, 2013 年 7 月 19 日, 九州大学 医学部百年講堂 (福岡市)

- ⑧ 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評価、第 66 回酸化ストレス学会, 2013 年 6 月 14 日, ウィンク愛知 (名古屋市)

[その他]

ホームページ等

京都工芸繊維大学ベンチャーラボラトリー

ホームページ

[http://www.vl.kit.jp/ja/project/project\\_01.html](http://www.vl.kit.jp/ja/project/project_01.html)

デリカフーズ株式会社 ホームページ

[http://www.delica.co.jp/press/index\\_26.html](http://www.delica.co.jp/press/index_26.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 智子 (YAMAGUCHI Tomoko)

京都工芸繊維大学・ベンチャーラボラトリー

・ 研究員

研究者番号 : 90644914