

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750034

研究課題名(和文) ESRスピントラップ法を用いた食用油の酸化評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of method to evaluate oxidation levels for vegetable oil using ESR spin trap method

研究代表者

亀谷 宏美 (KAMEYA, Hiromi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門 食品安全研究領域・主任研究員

研究者番号：20585955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ESRスピントラップ法により、加熱植物油中の過酸化由来のフリーラジカルを定性、定量した。従来の研究で行なわれたような自動的なラジカル発生法は再現性が乏しくまた微弱な信号しか得られなかったのでPBNをスピントラップ剤として用い、紫外線照射によって生じるラジカルのアダクトを検出した。その結果、ラジカル濃度が植物油の酸化の進度に比例して増加することを見出した。ESR信号の解析により、植物油中でESR信号を示すラジカル種はPBNの $\cdot\text{OOR}$ アダクトと $\cdot\text{OR}$ アダクトであると結論した。本研究により、ESRスピントラップ法を用いた食用油の酸化評価法を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：We performed a qualitative analysis and assay of free radicals derived from peroxides within heated vegetable oil, using the ESR spin trapping method. The spontaneous radical generation method that has been used in previous studies exhibited poor reproducibility and provided only weak ESR signals. We applied UV-light illumination to forcefully generate free radicals from the oxidized oil. The spin trap PBN was adopted as a free-radical trapping agent to detect free-radical adducts. With a strictly controlled UV-illumination procedure, we discovered that the free radical concentration increased as the heat-treatment time of the vegetable oil was extended, i.e., in proportion to the progress of oxidation. The analysis of ESR spectra led to the conclusion that the free radicals showing ESR signals in vegetable oils were alkyl peroxy and alkoxy radical. We included that we established the method to evaluate oxidation levels for vegetable oil using ESR spin trap method.

研究分野：食品化学

キーワード：電子スピン共鳴 油 酸化 ラジカル

1. 研究開始当初の背景

食用油は揚げ物や炒め物に利用されるだけでなく加工品にも用いられており、食用油が食品分野で使用される範囲は極めて広い。これらの食用油あるいは油含有食品は、調理による加熱や製造後消費されるまでの保存中に酸化を主体にした種々の反応が進行し、外観上、実用上および栄養上の変化、いわゆる「油脂の劣化」もしくは「油脂の酸化」が起こる。食用油は酸化過程で主にペルオキシラジカル($ROO\cdot$)とアルコキシラジカル($RO\cdot$)を生成する。ペルオキシラジカルは不安定状態なため即座に食品成分と反応して二次的な酸化反応を引き起こし、一部有害な物質となることが報告されている(図1)。



図1 食用油の加工調理段階で生成する有害物質

保存・加工調理による食用油の酸化は、食生活にかかわる重要な評価項目の一つである。油脂の酸化評価は一般的に、過酸化価(PV)、酸価(AV)、カルボニル価(CV)、TBA 価など多種多様な指標がある。しかし、食用油を用いた調理、例えば揚げ調理では素揚げで30~40秒、天ぷらでは1~2分と非常にと短時間のため、食用油の酸化程度はごくわずかであり、初期的な酸化をPV、AVなどで評価することは不可能とされている。

ESRは含水量の少ない食物試料中のラジカルを感度良く直接検知同定するのに有用な測定方法である。油脂を含む乾燥食品では、保存期間中に生成したラジカルが組織やタンパク質に捕捉安定化され直接ESRにより計測可能であり、そのラジカル量(ESRで計測される信号強度)が食品鮮度の損失に従って増加するという報告がある。しかし、液状油の酸化過程で生成されるラジカルは構造の不安定性および定常状態におけるラジカル濃度が検出限界より低いことからESR法で直接計測することは困難とされてきた。

ESRにはESRスピントラップ法という計測法がある。これは液体試料中のラジカルをトラップして直接的に検出する。報告者らはESRスピントラップ法を用いた食品の抗酸化能力評価を報告している。近年、このESRスピントラップ法を用いた液状油中のラジカル計測について報告されているが、再現性が低く、一般的な油の品質評価法(PV、AV)との比較検討も行われていない。

2. 研究の目的

報告者はこれまで、食品に含まれる微量なラジカルの検出、ESRスピントラップ法による食品の抗酸化能力評価を行ってきた。また、

平成22年より食品総合研究所で「食品のフードチェーンを通じて発生する新たなリスクに対する多面的な安全性確保技術の開発のため、加工調理段階の酸化ストレスにより生成する食品中の有害物質成分の検出と生成メカニズムの解析」に関する研究を開始した。これまでの研究成果から、ESRを用いることにより加工調理段階で生成する食品中のラジカルを解析できると考えた。特に、保存や加熱による食品の酸化はラジカルが関わることが知られていることから、食生活にかかわる重要な評価項目の一つである「油の酸化評価」にESRを用いることを着想した。

報告者は、ESRスピントラップ法による食品の水溶性成分における抗酸化能評価について光照射ラジカル発生系を構築してきた。そこで、この研究で培った、ラジカルをトラップしてESRにより測定する技術、数十種類あるトラップ剤やそのアダクト(付加物)信号の知識を応用して食用油の酸化評価法に発展させる。そのための基礎研究として、ESRスピントラップ法を用いて加熱したナタネ油を計測したところ、加熱時間とともに信号強度が増加するラジカルを再現性良く検出することに成功し、ESRスピントラップ法により油の酸化が評価できる可能性を見出した。以上から、本研究では基礎研究の成果をふまえ、ESRスピントラップ法を用いた食用油の酸化評価法確立を目的とした。

本研究の特色・独創的な点は、ESRスピントラップ法を用いて食用油の酸化評価、すなわち品質評価を行うことである。本研究により、これまでの手法では得られなかった食品の情報を明らかにすることができ、食品の新たな品質評価法の確立に役立てることができると予想される。

3. 研究の方法

研究期間内に次の3つの項目について検討を行う。

(1) 食用油から再現性良くESR信号を検出する測定方法について、詳細な条件を明らかにする。

(2) 食用油を試料としてESRスピントラップ法による計測を行う。

加熱による酸化・劣化処理を行い、ESRスペクトルの信号変化を解析する。

酸化・劣化程度と関連し、酸化評価法に利用可能なESRパラメータ(信号強度、積分値など)を明らかにする。

(3) 同一の試料を本研究の手法と現在一般的に使用されているPV、AV、CV法などで計測する。

本研究により開発した酸化評価法の結果と比較する。

ESR スピントラップ法による食用油の酸化評価の有用性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ESR 測定条件の検討

本研究では調理で広く利用されている液状の植物油を対象とした。しかし、液状油は酸化反応過程で生成されるペルオキシラジカル($ROO\cdot$)とアルコキシラジカル($RO\cdot$)の構造が不安定および定常状態におけるラジカル濃度が検出限界より低いことから、一般的な ESR の測定法で直接計測することは困難であった。実際、ナタネ油に脂溶性の高いスピントラップ剤 PBN (Phenyl-*tert*-butyl-nitron) を溶解させて ESR で計測したが、スピントラップ剤 PBN を加えただけでは ESR 信号は検出できないことを確認した。そこで、ESR スピントラップ法による抗酸化能評価で利用する手法、サンプルへの光照射を導入した。スピントラップ剤 PBN を加えたナタネ油に短時間の紫外線照射を行うことで、再現性の高いスペクトルが検出されることを確認した。計測に適した条件として、スピントラップ剤 PBN の濃度は 100 mM、紫外線照射時間は 10 秒であった。

(2) 食用油の計測

加熱油の ESR スペクトル

基礎研究の結果から得られた測定法より、ナタネ油を 120℃ で 1 時間加熱して ESR 計測した場合、全体的な信号の強度が増えることを確認した。この信号強度の増加量は加熱時間に依存性があったため、ナタネ油の酸化・劣化程度と相関している可能性があると考えた。そこで、酸化を促進する要因のひとつである加熱処理を行い、酸化した食用油(オリーブオイル、ナタネ油、綿実油)から得られる ESR スペクトル信号変化を解析した。

具体的な計測方法は、3 種の食用油を 200 μ L 採取して、スピントラップ剤 PBN を溶解、食用油を入れたディスプレイセルを ESR にセットした。紫外線照射直後に 1 分間計測したところ、加熱油、非加熱油、両者へ紫外線照射して発生するラジカルを捕捉し、アダクトスペクトルとして ESR で観測した(図 2)。

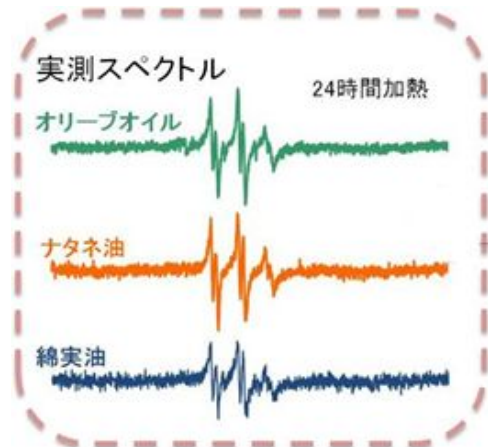


図 2 食用油の ESR スペクトル

一般的に酸化した油には過酸化ラジカル(ペルオキシラジカル($ROO\cdot$)とアルコキシラジカル($RO\cdot$))が生成される。そこで、過酸化ラジカルの標準スペクトルを利用して、2 種のラジカルを同時観測した場合のシミュレーションスペクトルを作成した(図 3)。このシミュレーションスペクトル(図 3)と、食用油で観測された ESR スペクトル(図 2)を比較すると、両者のスペクトルパラメータはすべて一致した。このことから、食用油で観測したラジカルは、2 種の過酸化ラジカルであると同定できた。2 種の過酸化ラジカルは、非加熱の油でも観測できたが、加熱履歴がある食用油では明らかに信号強度、すなわちラジカル発生量が増加した。

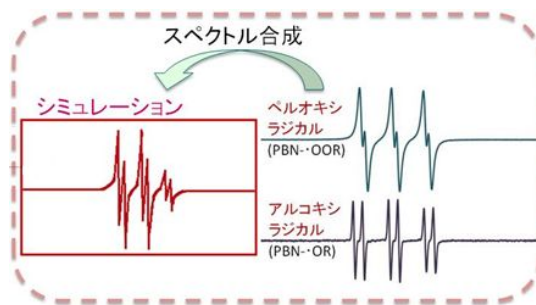


図 3 過酸化ラジカルを合成したシミュレーションスペクトル

ESR 測定に用いた Bruker BioSpin 株式会社製の EMX-plus X-band では、磁場範囲 3520 \pm 100 G、マイクロ波強度 6 mW、磁場変調 1.00 G のとき、スピントラップ剤と食用油中の過酸化ラジカルによって生成されるアダクトが最適に観測された。

(3) 従来の酸化評価法との比較

加熱した食用油の一部を ESR 測定に供し、残りをを用いて過酸化物価と酸価を求め、ESR スピントラップ法の結果と比較した。

その結果、食用油の加熱時間の増加によって ESR スピントラップ法での評価値、過酸化物価、酸価のいずれも増大した。また、その増加には非常に高い相関関係が見られた。

ESR スピントラップ法により、食用油に紫外線照射して発生させたラジカルを同定定量することにより、現在一般的に使用されている基準油脂分析試験法である過酸化物価と酸価と同様に、油の加熱酸化を評価できる可能性が示された。

以上の研究結果から、ESR スピントラップ法を用いた食用油の酸化評価法を確立することができ、過酸化物価、酸価をよりも簡便で短時間で測定可能な簡易酸化評価法の開発につながる有益な成果を得ることができた。

<引用文献>

- 藤田哲 (2000) 食用油脂, 幸書房.
太田静行 (1977) 油脂食品の劣化とその防止, 幸書房.
畑江敬子 (2011) 調理学第2版, 東京化学同人.
Ottaviani M.F. (2001) Journal of Agriculture Food Chemistry. 49: 3691-3696.
Giuffrida, F. (2007) Food Chemistry. 101: 1108-1114 .

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

亀谷 宏美, 蔦 瑞樹, 藤田かおり, 等々力 節子, 杉山純一 (2016) 電子スピン共鳴分光法と Partial Least Squares 回帰分析による小麦粉灰分の推定. 日本食品科学工学会誌. 63: 127-131. (査読有)

亀谷 宏美, 等々力 節子 (2016) 電子スピン共鳴分光法によるガンマ線照射大豆のラジカル消去活性分析. 食品照射. 51: 11-16. (査読有)

H. Kameya, M. Ukai (2014) Photochemical Method to Evaluate Oxidation Levels in Heat-Treated Vegetable Oil: Comparison with Peroxide-Value and Acid-Value. Journal of Materials Science and Engineering. 3: 299-308. (査読有)

[学会発表](計4件)

H. Kameya (2016) Evaluation of the radical scavenging abilities of tomatoes using ESR spin trapping method. The 4th Awaji International Workshop on Electron Spin Science and Technology. 2016.6.19-22 淡路夢舞台 (兵庫県・淡路市)

亀谷 宏美, 蔦 瑞樹, Trivittayasil, 小田切 雄司, 杉山 純一, 等々力 節子. ESR によるトマトジュースのラジカル捕捉活性評価. 日本食品科学工学会第 62 回大会. 2015.8.27-29 京都大学 (京都府・京都市)

H. Kameya, J. Watanabe, Y. Ishikawa, S. Todoriki (2014) Evaluation of multiple radical scavenging capacities in foods using ESR spin trapping method. 14th International Nutrition and Diagnostics Conference. 2014.9.1-5 Praha (Czech Republic)

H. Kameya, S. Todoriki (2014) Evaluation of multiple radical scavenging capacities in foods using ESR. 43rd UJNR Food and Agriculture Panel Meeting. 2014.10.20-24 Athens (America)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀谷 宏美 (KAMEYA, Hiromi)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門 食品安全研究領域・主任研究員
研究者番号: 20585955