

スピントラッピング-ESR 法による食品中成分の抗酸化能評価

Evaluation of Anti-oxidation Activity of Food by Spin-trapping ESR Measurements

遠藤伸之*1

Nobuyuki ENDO

Abstract

The anti-oxidation revitalization of the element included in the plant resource and food was evaluated. The problem with a difficult identification of the active oxygen was overcome by the change into current techniques, and the new use of the reagent CYPMPO and the spin-trapping ESR method. The evaluation of a selective deletion action of hydroxyl radical and superoxide anion radical was able to be executed by using this technique, and this method confirmed to the clarification of a detailed anti-oxidation and the radical deletion mechanism an effective metrology.

要約

植物資源・食品に含まれる成分について抗酸化活性の評価を試みた。従来の方法に変わる新型検出試薬 CYPMPO とスピントラップ ESR法を使用することにより、従来法の欠点である活性酸素種の同定の困難さを克服し、生体内で重要な働きを担う代表的な酸素ラジカルであるヒドロキシルラジカルとスーパーオキシドアニオンラジカルの選択的な消去能評価を行うことができ、詳細な抗酸化・ラジカル消去機構の解明に有望な手法であることを確認した。

I. 緒言

バイオマスは生物に由来する資源で、その中に抗菌性や抗酸化性などの機能を有する成分を多く含むことが知られている。農水産物では食用部分を除去した残さ部分からの有効成分の抽出によって、生理活性を持った化学物質を回収して利用する例も多く見られる。また、可食部分に対しても機能性の特定成分により種々の病気に対する予防効果が認められて価値が高まる例が多い。食品の機能性の中でも、抗酸化性は生活習慣病や老化との関連性が示唆される活性酸素¹⁾などの酸化ストレスを抑制する能力として特に注目されており、抗酸化能の高い食品は付加価値が高まる例が多い。高付加価値化の成功例として静岡県の茶カテキン、沖縄県のウコン、ニガウリなどがあり、これらをPRすることで地域産食品の高付加価値化に成功している。抗酸化成分を含む食品の検索は進められているが、抗酸化機能を簡便に評価する方法は少ない。既存法としては安定なラジカルである 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) との反応を DPPH の吸光度減少で測定する方法²⁾が用いられるが、反応する化学種を特定することはできない。また、DPPH はラジカルではあるが活性酸素で

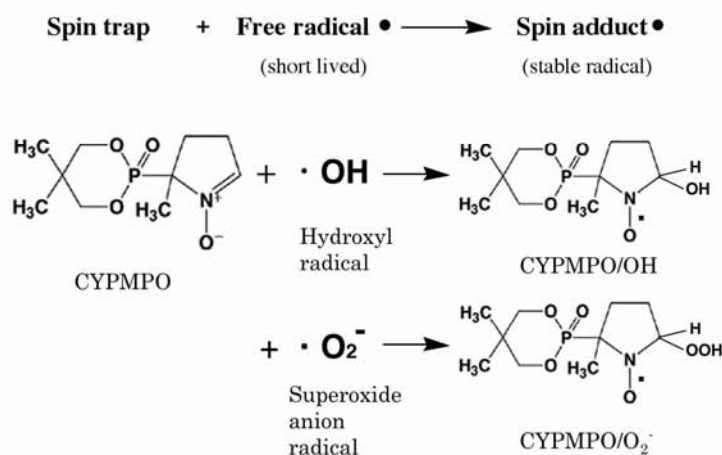


図 - 1 スピントラッピング法

*1 研究開発部 生物資源グループ

はなく、生体内で発生するラジカル種と反応性が異なるため、この測定で高活性を示すものが、実際に生体作用があり効果をもたらすとは限らない。活性酸素種を測定する手法としてスピントラッピング-ESR 法³⁾がある、この方法は不安定で短寿命なため直接測定することのできない活性酸素種を非ラジカルであるスピン捕捉剤(spin trap)と反応させ、安定で長寿命のスピンアダクト(spin adduct)に変換し、これを電子スピン共鳴装置(ESR)で測定する方法である(図-1)。スピンアダクトの構造は付加したラジカル種によって異なるため、ESR信号は反応したラジカル種の種類によって変化する。観測されたESR信号の形状からもともと発生していたラジカル種の同定が可能で、信号強度から定量が可能である。これまでスピントラッピングESR法のスピン捕捉剤として5員環ニトロ化合物の5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)が多用されてきた。この捕捉剤は生体内で重要な働きを担っていると考えられているヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)やスーパーオキシドアニオンラジカル($\cdot\text{O}_2^-$)と反応して特徴のある信号を与えることから、活性酸素研究で使用されてきた。しかしながら、DMPOは $\cdot\text{O}_2^-$ との反応が遅い、 $\cdot\text{O}_2^-$ と生成するアダクトの寿命が短いため、熟練した操作が求められている。またDMPOはラジカル捕捉反応ではない酸化反応と水の求核付加反応によってラジカル捕捉反応と同じ生成物を生じ、同じESR信号を出すことがあり⁴⁾、誤った解釈を与える可能性が指摘されている。DMPOに変わるスピン捕捉剤の開発が進められており、近年DMPOと同じく5員環ニトロ化合物側鎖に環状リンを持つ5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (CYPMPO)が報告された⁵⁾。CYPMPOはDMPOの最大の弱点であった $\cdot\text{O}_2^-$ との反応が速く、生成するアダクトも安定であった。加えて $\cdot\text{OH}$ アダクトと、 $\cdot\text{O}_2^-$ アダクトの信号が明瞭に区別でき(図-2)個別の評価に優れる。本研究ではCYPMPOをスピン捕捉剤として使用し、食品中に含まれるビタミン類との競争反応で $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ の消去能評価方法を確立することを目的として実験を行った。

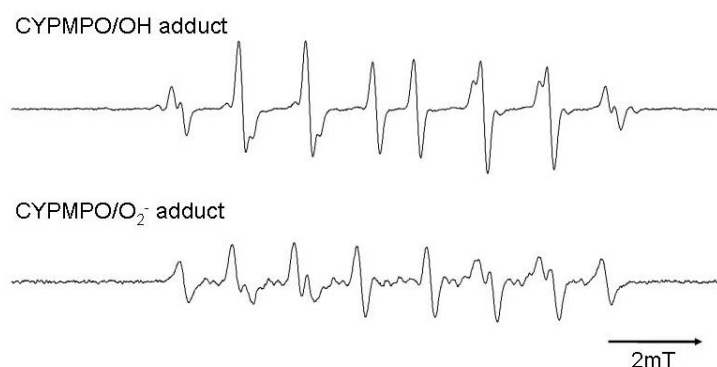


図-2 CYPMPO-酸素アダクトのESRスペクトル

II. 実験

CYPMPOはラジカルリサーチ社から購入したものを使用した。ビタミンB1、ビタミンB2、ルチンはナカライテスク社の特級試薬を使用した。安息香酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、ジメチルスルホキシド、マニトール、ヒポキサンチン、ジエチレントリアミン五酢酸ナトリウム(DETAPAC)、過酸化水素水は関東化学社製の特級試薬を使用した。キサンチンオキシダーゼはRoche社製から購入したものを使用した。水はミリポア社製超純水製造装置milli-Q gradientで精製したものを使用した。リン酸緩衝液はリン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウムの各水溶液を調合してpH7.4とし、0.2 μm のフィルターでろ過したものを使用した。

ESR装置は日本電子製X-band ESR装置JES-TE-300にラジカルリサーチ製フリーラジカル解析システムWin-RADを追加したシステムを使用し、データはWin-RADに取り込んで解析した。水溶液測定には石英製偏平セルを使用した。紫外線照射はラジカルリサーチ製RUVF203SFを用い、キセノンランプから発生させた光を熱カットフィルターに通し、石英ファイバーでキャビティ内に直接照射した。ESR測定条件は周波数9.2GHz、マイクロ波出力8.0mW、掃引幅334.5 \pm 7.5mT、磁場変調100kHz、0.1mT、時定数0.1秒、掃引時間2分とした。

ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)の測定はリン酸緩衝液 50mM、CYPMPO 10mM、試験試料 1~10mM、過酸化水素 100mM に各成分の最終濃度となるよう調製した溶液を偏平セルに入れ、紫外線を5秒照射して照射直後から測定を開始した。スーパーオキシドアニオンラジカル($\cdot\text{O}_2^-$)の測定はリン酸緩衝液 50mM、CYPMPO 10mM、試験試料 1~10mM、DETAPAC 0.5mM、ヒポキサンチン 1mM、キサンチンオキシダーゼ 0.2U/ml に各成分の最終濃度となるよう調製した溶液を偏平セルに入れ、キサンチンオキシダーゼ投入後30秒してから測定を開始した。

ラジカル発生系にスピン捕捉剤である CYPMPO と、抗酸化活性を評価したい試料を共存させると CYPMPO と試料が競争してラジカルと反応する。試料とラジカルの反応生成物は安定なラジカルとなることは少なく、ESR 測定で観測されるのはラジカルのみなので、反応後 ESR 測定で観測されるのは CYPMPO と反応した分のみである。CYPMPO 量を一定とし、試薬を加えると加えない場合で強度を比較測定するとラジカルとの反応性が高い試薬ほど低濃度添加で CYPMPO-ラジカルアダクトの強度が減少する。この方法でラジカルとの反応性を評価した。

III. 実験結果

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で発生させた $\cdot\text{O}_2^-$ を CYPMPO で捕捉し、各種ビタミン類を濃度 50 μM ~ 1mM で添加し ESR スペクトルを観測した。いずれも特徴的のある CYPMPO/ O_2^- アダクトの信号が観測された。信号の半減期は20分で、他の信号が出ることなく一律に減少した。従来 DMPO を用いたスピントラッピング ESR 法では、CYPMPO/ O_2^- アダクトの半減期は数分で、時間の経過とともに DMPO/ OH アダクトの信号が増加するので実験者の熟練度によって異なる結果を得たり、誤った解釈を与える恐れがあったが、本手法ではその心配は少ない。

図 - 3はビタミン B1、B2、とそばに含まれる抗酸化成分ルチンを各 1mM 添加した時に観測された ESR スペクトルである。ビタミン B1 (図 - 3-b) は無添加 (図 - 3-a) と大きな変化はないがビタミン B2 (図 - 3-c)、ルチンは著しく減少している。従来法の DPPH 法ではいずれもほぼ同様の消去作用が認められた。DPPH 法では DPPH ラジカルとの反応や還元反応を含むため異なる結果になったと考えられる。

続いて過酸化水素水に紫外線を照射して $\cdot\text{OH}$ 発生させる系で同様の実験を行った。結果を図 - 4 に示した。先の $\cdot\text{O}_2^-$ の結果と異なり、ビタミン B2 が強い消去作用を示しているが、ビタミン B1 はその半分程度、ルチンはビ

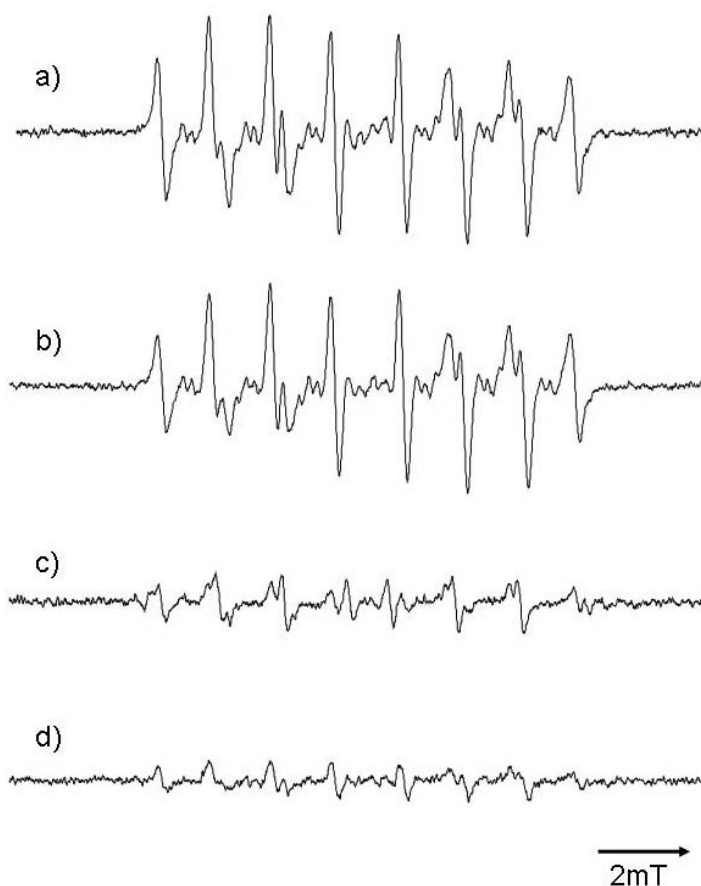


図 - 3 スーパーオキシドアニオンラジカルの消去作用
a)Control、 b)1mM ビタミン B1、 c)1mM ビタミン B2、
d)1mM ルチンを添加して測定

タミン B2 の 1/6 程度の消去作用であった。ルチンは抗酸化能が高いと評価されているが、 $\cdot\text{OH}$ の消去能は低く、 $\cdot\text{O}_2^-$ の消去能が高いことが分かる。従来法では個別のラジカル種との反応性は評価できなかったため、この手法は非常に優れた知見が得られる。図 - 5 に更に数種の試薬に関して消去能を比較した結果を示した。いずれも試料濃度を薄くすると信号減少は小さく、濃度を高めると Control に近づき濃度依存的な効果が認められた。

他の脂溶性ラジカルも試みたが、水のみで溶解可能な濃度での測定では消去能が評価できるほど減少せず、アルコールやジメチルスルホキシドなど溶媒を用いる必要があった。この場合溶媒もラジカル消去作用を示すのでこれらを考慮する必要がある。今後はこれらの知見を増やす。またラジカル発生系についても考慮し、より低濃度での測定や異なるラジカル種に対する評価法も検討していく予定である。

IV. 結語

従来の手法に加えて、新しい抗酸化活性の測定方法を開発した。農産物などの機能性評価法として新たな手法であり、既存法より精度の高い手法であることが示された。今後、地域特産品に対して本手法による測定を行い、高機能食品としての可能性を調査する。

参考文献

- 1) J.M. McCord, I. Fridovich: J. Biol. Chem. 244 (1969) 6049-6055.
- 2) 戸高大介, 竹中陽子他: 日食工誌 46 (1999) 34-36.
- 3) E.G. Janzen, B.J. Blackburn: J. Am. Chem. Soc. 91 (1969) 4481-4490.
- 4) K. Makino, A. Hagi: Can. J. Chem. 70 (1992) 2818-2827.
- 5) M. Kamibayashi, S. Oowada et al.: Free Radical Research 40 (2006) 1166-1172.

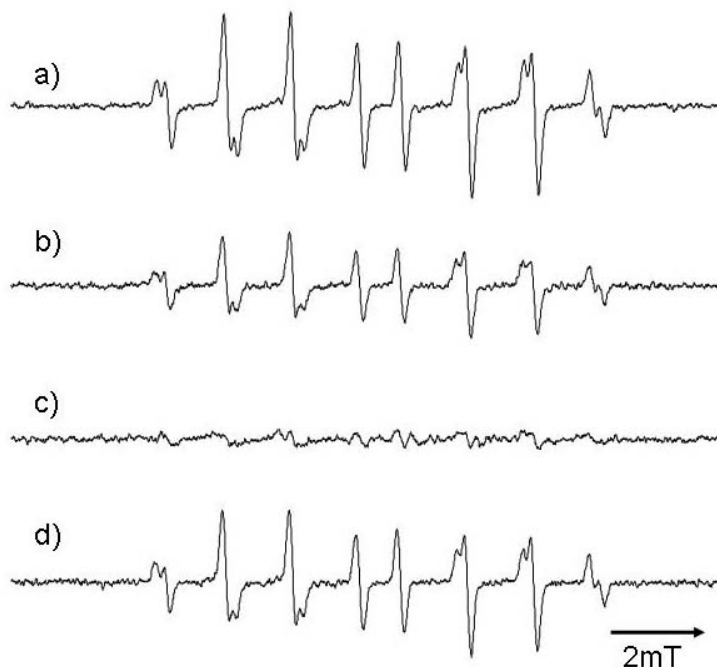


図 - 4 ヒドロキシルラジカルの消去作用
a)Control、 b)1mM ビタミン B1、 c)1mM ビタミン B2、
d)1mM ルチンを添加して測定

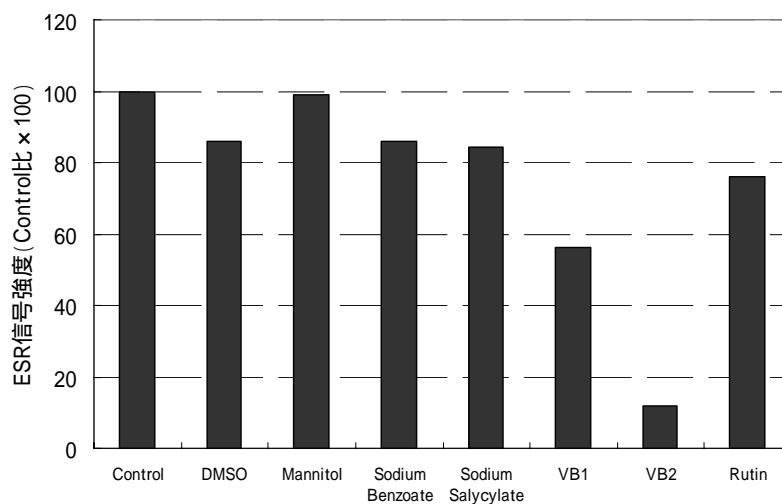


図 - 5 ヒドロキシルラジカルの消去能、各試薬は 1mM