

<平成 21 年度助成>

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

末石 芳巳

(岡山大学大学院自然科学研究科)

1. 緒 言

抗酸化物質は、一般に、活性酸素を消去する物質として知られており、高い関心がもたれている。体内で過剰の活性酸素は、体内消去システムや食品中の抗酸化物質によって消去され、健康が維持されている。しかしながら、ストレス、紫外線、など様々な要因によって人体はダメージを受けており、過剰の活性酸素が糖尿病等の疾患発生の原因となっている。これらを予防するためには野菜や果物中のビタミンなどの抗酸化物質を含む食品を摂取することが重要となるが、その食品にどの程度の抗酸化能力があるのか分からない場合が殆どである。抗酸化能力が食品にどれだけ含まれているのかを測定する方法として、近年、米国を中心に話題になっている測定法が ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) であり、酸素中心ラジカル消去能により抗酸化能力を分析する基準として、世界的で用いられるようになってきている¹⁾。さらに、米国では、ORAC 値を表記した食品が販売され、消費者に抗酸化力の程度を具体的な数値で表し、健康志向が高まっている。今後、日本においても、普及してくるものと思われる。これまで用いられている ORAC 測定法は、蛍光プローブによる蛍光の遅延現象の解析によるものである。その方法は煩雑であり、測定時間も要するといういくつかの欠点をもっている。それらの欠点の克服のため、我々は最近、ラジカルの反応性を直接追跡する簡便、迅速な ORAC 決定法として、抗酸化物質とスピントラップ剤との競争スピント

ラップ法を用いた ORAC-EPR 法を提案した²⁾。抗酸化物質の働きは酸素中心ラジカル (RO \cdot) だけでなく、一酸化窒素 (NO)、アルキルラジカル (R \cdot) などの消去もおこなうことはよく知られている。しかしながら、酸素中心ラジカルの他の活性ラジカル (例えば、NO およびメチルラジカル (アルキルラジカルの一種)) に対する消去能の評価 (定量化) 法についての報告は未だなされていない。本研究では、EPR スピントラップ法を用い、様々な活性ラジカルに対する抗酸化物質によるラジカル消去能を定量化し、抗酸化物質の活性ラジカル消去能プロファイルの構築をおこなった。

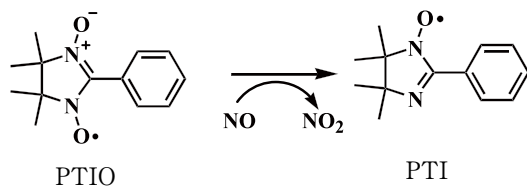
2. 実験方法

2.1 試 薬

水溶性および疎水性の様々な抗酸化物質は東京化成株式会社、和光純薬、およびナカライ社製のものを用いた：トロロックス (trolox)、グルタチオン (reduced glutathione)、コーヒー酸 (3,4-dihydroxy-cinnamic acid (caffeic acid))、アセチルシステイン (N-acetylcysteine (NAC))、ゲニステイン (genistein)、尿酸 (uric acid)、カテキン (catechin (CA))、エピカテキン (epicatechin (EC))、エピカテキンギャレット (epicatechin gallate (EGCg))、ケルセチン (quercetin (QR))、ケンフェロール (kaempferol (KAP))、ミリセチン (myricetin (MYR))、レスベラトロール (resveratrol (RESV))、アスタキサンチン (astaxanthin (ASX))。

一酸化窒素 (NO) はジエチルノノエイト (NONOate sodium salt (NONOate)) の熱分解、メ

チルラジカルはアセトキシトリメチル鉛の光分解から発生させた。測定溶媒としては 100 mM のリン酸緩衝液 (pH = 7.4) を用いた。メチルラジカルの捕捉には、スピントラップ剤としてよく知られている 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) (東京化成社製) を用いたが、DMPO のようなニトロソ化合物では NO の捕捉はできない。NO の検出には下記の反応を利用した 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO) (東京化成社製) を使用した³⁾。



Scheme 1

2.2 EPR 測定

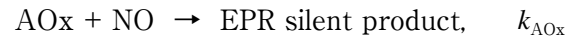
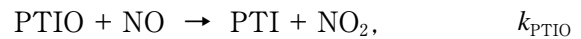
抗酸化物質による NO およびメチルラジカルの消去能の評価 (定量化) はラジカル捕捉剤との競争反応から見積もった。NO の場合は、抗酸化物質と PTIO、メチルラジカルは抗酸化物質と DMPO との競争である。

NO の消去能の定量化においては、PTIO と抗酸化物質を溶解した溶液に NONOate を加え、その EPR スペクトルを測定した。PTIO と PTI の 2 種類のラジカル種を含んだ溶液の EPR スペクトルは付属のソフトを用い、シミュレーションし、PTIO と PTI のスペクトル強度の比から 2 種のラジカル種の濃度比を見積もった。メチルラジカルの消去に関しては、トリメチル鉛化合物、DMPO、および抗酸化物質を含んだ溶液に紫外線を照射し、メチルラジカルを発生させ、DMPO-メチルアダクトの生成量から、DMPO と抗酸化物質の反応速度比を見積もった。NO およびメチルラジカル消去能の見積り方法の詳細は次に示す。

2.3 速度論的解析

NO の PTIO と抗酸化物質との消去競争反応は次

のように表される。



NO の捕捉相対速度は次式で与えられる。

$$\frac{d[\text{AOx}]/dt}{d[\text{PTIO}]/dt} = \frac{k_{\text{AOx}} [\text{AOx}]}{k_{\text{PTIO}} [\text{PTIO}]} = \frac{S_b - S_a}{S_0 - S_b} \quad (1)$$

ここで、 S_0 , S_a , および S_b はそれぞれ PTIO のみ、PTIO + NO, PTIO + NO + 抗酸化物質の場合の EPR スペクトルの積分値を表す。また、抗酸化物質 (AOx) と PTIO の濃度から生成速度比は次のように表すことができる。

$$\frac{S_b - S_a}{S_0 - S_b} = \frac{k_{\text{AOx}} [\text{AOx}]_0 - \alpha(S_b - S_a)}{k_{\text{PTIO}} \alpha S_b} \quad (2)$$

ここで、 α は定数である。右辺の $\{[\text{AOx}]_0 - \alpha(S_b - S_a)\} / \alpha S_b$ に対する左辺のプロットの傾きから、PTIO と抗酸化物質の NO 消去反応の速度定数比を見積もることができる。

メチルラジカルの抗酸化物質と DMPO との競争反応も同様に次のように表される。



DMPO スピンアダクトの EPR スペクトル強度と初濃度比 ($[\text{AOx}]_0 / [\text{DMPO}]_0$) との解析から、次式に従い、容易にラジカル消去能を見積もることができる²⁾。

$$\frac{d[\text{AOx}]/dt}{d[\text{DMPO}]/dt} = \frac{I_0 - I}{I} = \frac{k_{\text{AOx}} [\text{AOx}]_0}{k_{\text{DMPO}} [\text{DMPO}]_0} \quad (3)$$

ここで、 I はアダクトの EPR スペクトル強度、 $[]_0$ は DMPO および抗酸化物質の初濃度である。この場合は、 $[\text{AOx}]_0 / [\text{DMPO}]_0$ に対する $(I_0 - I) / I$ のプロットの傾きから速度定数比が求められる。

3. 結果と考察

3.1 水溶性抗酸化物質による NO の消去能

Fig. 1a には PTIO の EPR スペクトルを示した。NONOate の熱分解より NO を発生させた場合、NO と PTIO との反応により PTI が生成し、そ

れら2種類のラジカル種が観測できる (Fig. 1b)。抗酸化物質を添加した溶液でおこなうと、PTIの生成が明らかに減少し (Fig. 1c)、抗酸化物質 (trolox) と PTIO との競争が伺える。Fig. 2には、式 (2) に従った trolox/PTIO 系でのプロットを示した。原点を通る直線が得られており、式 (2) による見積りが妥当であることを示唆している。そのプロットの傾きより PTIO と様々な抗酸化物質との相対的反応速度定数 (k_{AOx}/k_{PTIO}) を見積もった (Table 1)。通常、ORAC 値はトロロックスの値を基準にして表される。Table 1にはNOの消去能力 (trolox 比) を ORAC 値とともに列挙し、棒グラフにより ORAC 値との比較を Fig. 3 に示した。本研究において用いた水溶性抗酸化物質の中では、尿酸が最も高いNOの消去能力を示している。グルタチオンとNACにおいては、NOの消去能力は観測できなかった。抗酸化物質によるRO・ラジカルの消去能 (ORAC) と比較すると、尿酸が最も高い消去能を示すことはNOの消去能の結果と一致しているが、グルタチオンおよびNACはわずかながらでも酸素中心ラジカルを消去するが、NOは消去されないことがわかる。

抗酸化物質によるラジカル消去反応の反応機構としては、抗酸化物質からの水素引き抜き反応または電子移動反応により進行すると提案されている⁴⁾。抗酸化物質とNOとの反応の機構を明らかにするため、抗酸化物質の酸化電位を測定し、NOの消去能との比較をおこなった。得られた酸

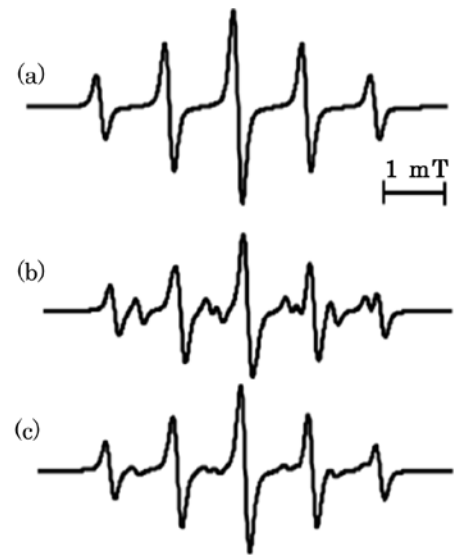


Fig. 1 (a) EPR spectrum of PTIO ($A_N = 0.82$ mT) before mixing NONOate. (b) EPR spectrum obtained after mixing NONOate (1 min incubation period). PTI ($A_N = 0.98$ and 0.43 mT). (c) EPR spectrum obtained after mixing trolox and NONOate.

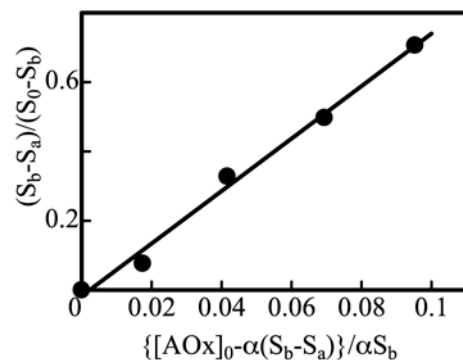


Fig. 2 A plot of $(S_b - S_a)/(S_0 - S_b)$ against $\{[AOx]_0 - \alpha(S_b - S_a)\} / \alpha S_b$ according Eq. 2.

Table 1 Relative NO radical scavenging ability of hydrophilic antioxidants

Antioxidant	NO		RO· (ORAC) ^a		E_{ox}/mV
	k_{AOx}/k_{PTIO}	vs. trolox	vs. trolox		
Uric acid	25.6 ± 0.6	3.5 ± 0.2	2.2	470	
Caffeic acid	8.8 ± 0.4	1.2 ± 0.1	1.6	310	
Trolox	7.3 ± 0.3	1.0	1.0	230	
Genistein	1.4 ± 0.2	0.19 ± 0.03	0.43	195	
Glutathione	~0	~0	0.57	-10	
NAC	~0	~0	0.40	< -10	

a) Alkoxyl radical generated from the AAPH decomposition.²⁾

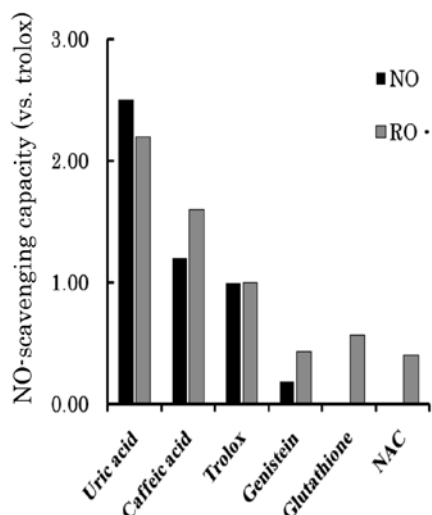


Fig. 3 Bar graphs for NO-scavenging capacity of hydrophilic antioxidants.

化電位 (E_{ox}) は Table 1 に示し、Fig. 4 には酸化電位と NO 消去能との関係を示した。抗酸化物質の酸化電位の増加とともに明らかに NO の消去能も増加しており、酸化電位が約 200mV 以上の抗酸化物質により NO が消去されるという興味深い結果を得た。酸化電位の測定値との良い相関だけで、反応機構の厳密な議論はできないけれども、NO と抗酸化物質との反応は、電子移動をともなう酸化還元反応から進行するものと思われる。

3.2 脂溶性抗酸化物質による NO の消去

通常、ORAC 値の測定は水溶液中でおこなわれている。カテキン、フラボノイドなどの脂溶性の抗酸化物質の測定に際しては、シクロデキストリン (CD) の包接現象を利用し、水溶液に可溶にし ORAC 値を測定する方法が提案されている⁵⁾。

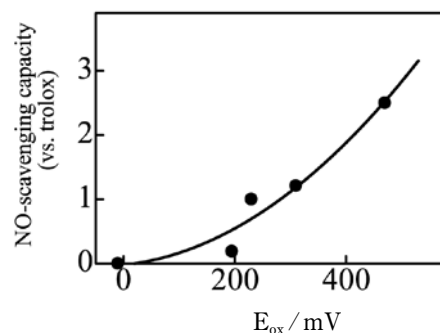


Fig. 4 The relationship between trolox-equivalent NO-scavenging capacities and oxidation potentials of hydrophilic antioxidants.

本研究においても、CD による可溶化、つまり、包接化合物の NO 消去能を ORAC-EPR 法により決定した。様々なシクロデキストリンが市販されているが、ここでは、比較的大きな分子である抗酸化物質の包接に適し、また、水への溶解性が高められた修飾シクロデキストリン (heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin (DM- β -CD)) を使用した。PTIO の約 40 倍過剰の DM- β -CD を溶液に添加することにより、すべての抗酸化物質は包接化合物として溶解し、また、すべての PTIO は包接化合物として溶液中に存在することを確認した。脂溶性抗酸化物質の NO 消去能の決定は、CD を加え、抗酸化物質を溶解したのち、前項と同様に、包接された PTIO と様々な包接抗酸化物質との NO 消去速度の比を式 (2) に従い求めることができる。得られた速度定数比およびトロロックスの NO 消去速度に対する相対値を Table 2 にまとめた。また、Fig. 5 にはそれらの結果を棒グ

Table 2 Relative NO radical scavenging ability of lipophilic antioxidants in the presence of DM- β -CD

Antioxidant	NO		RO· (ORAC) ^a
	k_{AOx}/k_{PTIO}	vs. trolox	vs. trolox
RESV-CD	4.29 ± 0.21	26.8 ± 1.3	0.64
CA-CD	1.41 ± 0.07	8.8 ± 0.4	0.96
MYR-CD	1.16 ± 0.06	7.3 ± 0.4	3.16
EC-CD	0.55 ± 0.03	3.4 ± 0.2	0.94
EGCg-CD	0.34 ± 0.02	2.1 ± 0.1	1.29
KAP-CD	0.19 ± 0.01	1.2 ± 0.1	0.37
Trolox-CD	0.16 ± 0.01	1.0	1.0

a) Alkoxy radical generated from the AAPH decomposition.⁶⁾

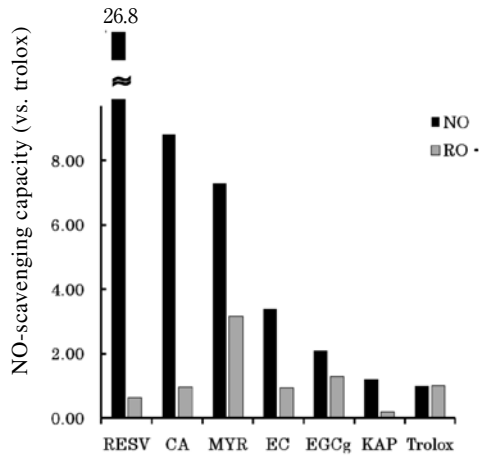


Fig. 5 Bar graphs for NO-scavenging capacity of lipophilic antioxidants.

ラフで示した。脂溶性の抗酸化物質においては、カテキン類、フラボノイド類いずれの抗酸化物質もトロロックスのNO消去能より高く、RO \cdot ラジカルの消去能との相関は良くないという結果を得た。特に、レスベラトロールは非常に高いNO消去能を示している。ラジカル消去能の評価(定量化)に対するCD包接の効果の検討が充分にはなされていないので、今後さらなる検討が必要であるが、現時点においても、重要な結果が得られている。脂溶性抗酸化物質は、老化および疾患発生の原因である活性酸素(酸素中心ラジカル)等の消去能も高いが、生体機能性因子であるNOの消去能も高いため、脂溶性抗酸化物質の摂取においては注意が必要である。

3.3 水溶性抗酸化物質によるメチルラジカルの消去能

アセトキシトリメチル鉛の光照射によりメチルラジカルを発生させ、ラジカル捕捉剤であるDMPOに捕捉させたスピニアダクトのEPRスペクトルをFig. 6に示した。得られたスペクトルは



Fig. 6 EPR spectra of DMPO-CH $_3\cdot$ adduct.

DMPOによるメチルラジカルを捕捉したラジカル種のみであることがわかる($A_N = 1.64$ mT, $A_H = 2.35$ mT)。抗酸化物質(例えば、trolox)を添加した溶液でおこなった場合、スピニアダクトの生成量は減少し、抗酸化物質とDMPOがメチルラジカルと競争的に反応していることがわかる。スピニアダクトの減少量(DMPOによるメチルラジカルの捕捉量)から式(3)に従い、種々の水溶性抗酸化物質によるメチルラジカル消去能の定量化をおこなった(解析の詳細は文献2参照)。種々の水溶性抗酸化物質によるメチルラジカル消去速度とDMPOによる捕捉速度の比を見積り、それらの結果を用い、ラジカル消去能比(k_{AOx}/k_{DMPO})を見積もった。さらに、ORAC値との比較のため、トロロックスによるメチルラジカル消去速度を基準に表した速度定数比(消去能 k_{AOx}/k_{trolox})を算出した。得られた結果は、Fig. 7にORAC値とともに棒グラフで示した。

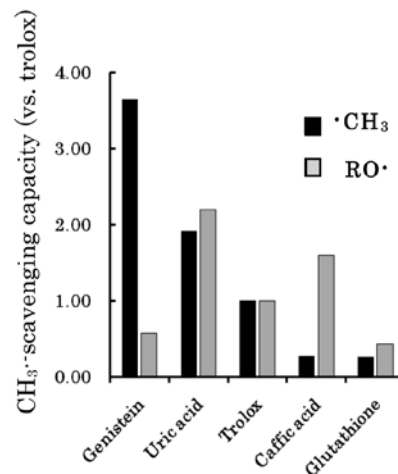


Fig. 7 Bar graphs for \cdot CH $_3$ -scavenging capacity of hydrophilic antioxidants.

ここでの研究に用いた水溶性抗酸化物質の中では、メチルラジカルの消去にゲニステインが最も

有効であることがわかった。また、全体的には、ORAC 値の測定に用いる酸素中心ラジカル (RO \cdot) と同程度の消去能を有しているが、両者の消去能の間に相関はないことも重要な結果である。いずれのラジカルも抗酸化物質からの水素引き抜き反応によりラジカルが消去されるものと思われるが、得られた結果に対するラジカル種による違いは、立体障害等のラジカルの反応性の違いによるものであろう。

3.4 脂溶性抗酸化物質によるメチルラジカルの消去能

脂溶性抗酸化物質のメチルラジカル消去能の測定に際しては、3.2 章と同様、DM- β -CD による包接現象を利用し、水溶液に溶解し、種々の脂溶性抗酸化物質のメチルラジカル消去能を評価した。スピニアダクトの EPR スペクトルから、DMPO 濃度の約 80 倍過剰の DM- β -CD を添加することにより、溶液中の DMPO メチルアダクトはすべてシクロデキストリンに包接されることがわかった。その結果に基づき、ここでは DMPO の約 80 倍過剰のシクロデキストリンを添加し、3.3 章の水溶性抗酸化物質のメチルラジカル消去能評価法と同様に、式 (3) に従い、抗酸化物質によるメチルラジカル消去速度定数と DMPO による捕捉速度定数の比 (k_{AOx}/k_{DMPO}) を見積もった。得られた結果より、トロロックスによるメチルラジカル消去速度を基準に種々の脂溶性抗酸化物質によるメチルラジカル消去能を見積り、ORAC 値との比較を示した (Fig. 8)。なお、メチルラジカルの捕捉には非常に有効な CYPMPO を用いるよう実験条件の設定を試みたが、CD 存在下での脂溶性抗酸化物質の評価における満足な条件が設定できなかったため、ここでは、ラジカル捕捉剤として DMPO を用いることとした。

アスタキサンチンが非常に高いメチルラジカルの消去能を示している。ここに用いた脂溶性抗酸化物質による酸素中心ラジカル (RO \cdot) の消去能

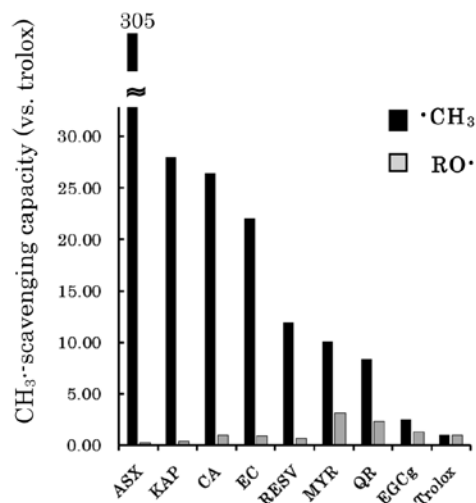


Fig. 8 Bar graphs for $\cdot\text{CH}_3$ -scavenging capacity of lipophilic antioxidants.

(ORAC 値) とメチルラジカルの消去能との間に相関はみられないが、全体的に、本研究で用いた脂溶性抗酸化物質はメチルラジカル (アルキルラジカル) に対して非常に高い消去能を有していることがわかる。

4. おわりに

食品に含まれる抗酸化物質による活性ラジカル消去能については、現在、酸素中心ラジカルの一種類 (RO \cdot) に関してのみ評価され、あたかもその数値が抗酸化物質による様々な活性ラジカル消去能であるとされていることを初めに述べた。本研究では、抗酸化物質による一酸化窒素およびアルキルラジカル (メチルラジカル) の消去能の評価法を構築し、また、ラジカル種の違いにより抗酸化物質との反応性 (消去能) に明らかな違いがあることを示すことができた。酸素中心ラジカルの消去能だけで抗酸化物質のラジカル消去能を議論できないことは明らかである。今後、抗酸化物質のラジカル消去能の評価 (定量化) には、さらに様々なラジカル種の消去能を調べ、総合的な評価法の構築をおこなう必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成金

を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団
に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Prior, R.L., Cao, G., Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol*, **299**, 50-62 (1999).
- 2) Kohri, S., Fujii, H., Oowada, S., Endo, N., Sueishi, Y., Kusakabe, M., Shimmei, M., Kotake, Y., An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Analytical Biochemistry*, **386**, 167-171 (2009).
- 3) Akaike, T., Yoshida, M., Miyamoto, Y., Sato, K., Kohno, M., Sasamoto, K., Miyazaki, K., Ueda, S., Maeda, H., Antagonistic action of imidazoline-oxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/NO (nitric oxide) through a radical reaction. *Biochemistry*, **32**, 827-832 (1993).
- 4) Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., The chemistry behind antioxidants capacity assays. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856 (2005).
- 5) Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K., Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1815-1921 (2002).
- 6) Sueishi, Y., Ishikawa, M., Yoshioka, D., Endohb, N., Oowada, S., Shimmei, M., Fujii, H., Kotake, Y., Oxygen radical absorption capacity (ORAC) of cyclodextrin-solubilized flavonoids, resveratrol, and astaxanthin as measured with the ORAC-EPR method. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, (2011) to be submitted.

Evaluation of radical scavenging capacity of hydrophilic and lipophilic antioxidants in foods

Yoshimi Sueishi

Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University

Nitric oxide (NO)-scavenging capacities of hydrophilic and lipophilic antioxidants were determined by using a competitive NO-scavenging method with PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetra-methylimidazoline-1-oxyl 3-oxide). NO was thermally produced from chemical precursors and the decrease of NO level by the presence of antioxidants was quantified. NO-scavenging rate constants of the antioxidants were in the order of: uric acid > caffeic acid > trolox > genistein > glutathione \approx N-acetylcysteine for hydrophilic antioxidants and RESV > CA > MYR > EC > EGCg > KAP > trolox for lipophilic antioxidants which were solubilized by modified β -cyclodextrin in aqueous solution. For the sake of comparison to oxygen radical scavenging capacity or oxygen radical absorption capacity (ORAC) of these compounds, NO scavenging capacity is expressed in trolox equivalent unit that has been customarily used in the ORAC method. For hydrophilic antioxidants, uric acid has been shown to have highest ORAC value among these hydrophilic antioxidants, but the order including other antioxidants was: uric acid > caffeic acid > trolox > glutathione > genistein \approx N-acetylcysteine, indicating that the agreement to NO-scavenging capacity was only fair. Among the lipophilic antioxidants tested, RESV showed the highest NO-scavenging capacity and trolox showed the lowest. The oxygen radical scavenging capacity of lipophilic antioxidants does not correlate with NO-scavenging capacity. We assumed that NO scavenging reactions by the phenolic antioxidants are via redox reactions but not free radical mechanism. We measured oxidation potentials of hydrophilic antioxidants in aqueous solution and the result indicates that the order of oxidation potential was exactly the same as NO-scavenging capacity, e.g., uric acid showed the highest oxidation potential (470 mV).

Recently, we proposed an oxygen radical absorption capacity method (ORAC-EPR) that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against free radicals and evaluated ORAC values for antioxidant compounds. In this study, using ORAC-EPR method, we determined the methyl radical scavenging capacity of well-known hydrophilic and lipophilic antioxidants. Lipophilic antioxidants were solubilized by modified β -cyclodextrin in water. The results indicated that the agreement between methyl radical scavenging capacity and ORAC-EPR values was not fair. The methyl radical scavenging capacities of lipophilic antioxidants are large compared with those of hydrophilic antioxidants. Typical ORAC-EPR values (in trolox equivalent unit) for lipophilic antioxidants are: catechin 26.4; epicatechin 22.0; epigallocatechin gallate 2.5; kaempferol 28.0; quercetin 8.4; myricetin 10.1; resveratrol 11.9; and astaxanthin 305, indicating that astaxanthin possesses the highest antioxidant capacity among the compounds tested.

Keywords: Electron paramagnetic resonance (EPR); Antioxidants; Radical scavenging capacity; Spin trapping; ORAC; Kinetics.