

食品成分の微弱発光生成による 抗酸化活性測定法に関する研究

岩井 邦久¹⁾

1) 青森県立保健大学大学院健康科学研究科

Key Words : ①抗酸化作用 ②フォトン (CL) ③食品 ④測定法

I. はじめに

多くの生活習慣病の発症は、活性酸素による生体の酸化障害が遠因であることが明らかになりつつあり、抗酸化作用を有する食品や食資源は酸化障害や生活習慣病の予防効果を備えている可能性が高いと考えられる。そのため、研究者のみならず食や健康に携わる産業界からは、食素材や加工食品等の抗酸化活性を簡便に評価し得る方法が求められている。

我々が新規抗酸化活性評価法として開発したXYZ-dish法^{1,2)}の最大の特徴は、微弱発光(CL)の測定により食品自体の抗酸化活性を評価できることであり、3成分(活性酸素種=X, 活性酸素消去物質=Yおよび受容種=Z)の存在でCLが生成する原理³⁾を応用している。実際に、一次スクリーニングとして本法で県内食資源を多数評価した結果、ガマズミ、大豆、根菜類等に抗酸化活性および有益な生理作用を見出してきた^{4,5)}。

その一方で、既知の抗酸化物質でありながらXYZ-dish法による活性が認められない化合物の存在も明らかとなりつつある。これは、XYZ-dish法があらゆる物質を評価しきれないことを示しており、これを改善し有用性を高めることが必要となっている。

II. 目的

そこで本研究は、XYZ系CL発光原理を検証するとともに、CL生成メカニズムの解明を目的とした。さらに、スクリーニング法としての有用性を高め、体系化するために、CL生成に必須の成分、寄与する成分、増強成分および阻害成分を検討した。

III. 研究方法

1. XYZ系CLにおける各因子の変化の検討

過酸化水素(H_2O_2 , X)、エピガロカテキンガレート(EGCg, Y)およびアセトアルデヒド(CH_3CHO , Z)を使用し、Y, Y+X, Y+ZおよびY+X+Z溶液を室温でインキュベート後にLC/MSにて分析するとともに、スピントラップ法でラジカル消去活性⁵⁾を測定した。

2. XYZ系CLにおける抗酸化活性およびラジカル消去活性の関連の検討

没食子酸 (GA), アスコルビン酸 (AsA), Trolox および α -Tocopherol (Toc) を Y 試料とし, CLA-110 (東北電子産業) を用いた XYZ-dish 法^{1,2)} による CL および β -Carotene 法⁶⁾ による抗酸化活性を測定した。XYZ-dish 法では, H₂O₂ (X) および CH₃CHO (Z) 含有リン酸緩衝液 (pH7.0) と MeOH の 1 : 1 混合液 (XYZ 反応液) を Y 試料へ注入して CL 生成量を測定し, 標準物質とした 1mMGA の CL を 1unit として試料の活性値に算出した。

3. XYZ系CLの波長特性の検討

CLA-SP2 (東北電子産業) を使用し, ガレート類, アントシアニン類およびカテキン類に XYZ 反応液を注入し, 生成する CL スペクトルを測定した。

IV. 結果および考察

1. XYZ系CLにおける各因子の変化の検討

Y とした EGCg の変化を表す LC/MS クロマトグラムを図 1 に示した。Y+X, Y+Z では新たなピークは見られ

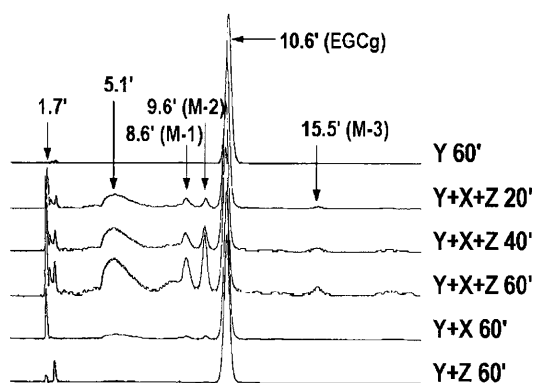


図 1 EGCg (Y), H₂O₂ (X), CH₃CHO (Z) の組合せとインキュベーション時間による LC/MS クロマトグラム

なかったが, Y+X+Z では 8.5 (M-1), 9.5 (M-2) および 15.1 (M-3) 分のピークが時間とともに増大し, EGCg 自体は減少した。M-1 ~ M-3 の分子量は 490, 478 および 288 と推定された。また, Y+X+Z のラジカル消去率は Y 単独に比べて増加し, これには CH₃CHO の関与が推察された。今後, M-1 ~ M-3 の構造解析, これらの変化と活性との関連の解明が課題である。

2. XYZ系CLにおける抗酸化活性およびラジカル消去活性の関連の検討

AsA, Trolox および Toc の XYZ-dish 法による活性 (CL) は殆どなかったが, β -Carotene 法では Trolox および Toc が GA の 2 倍の活性を示した (表 1)。また, GA に AsA を添加した場合に CL 生成の減少傾向が認められた。XYZ 系での Y の働きは X のエネルギーを Z へ遷移させる作用であり, AsA にはその遷移作用がない

表 1 GA, AsA, Trolox および α -Toc の XYZ-dish 法, β -Carotene 法による抗酸化活性

	GA	AsA	Trolox	Toc
XYZ-dish*	(H ₂ O ₂) 1.000±0.071	0.012±0.001	0.014±0.001	0.016±0.002
	(\cdot OH) 2.280±0.156	0	0.007±0.000	0.008±0.003
β -Carotene**	1.000	0.504	1.937	2.492

*XYZ-dish 法では H₂O₂ に対する GA の CL 量を 1.0 として各化合物の CL 量を換算した。
** β -Carotene 法では GA の活性値を 1.0 として各化合物の活性を示した。

ために CL が生成しないものと考えられた。

3. XYZ系CLの波長特性の検討

ガレート類, アントシアニン類およびカテキン類の CL スペクトルで波長極大領域の差が認められ, 活性酸素種による波長極大のシフトは認められなかった (図 2)。この結果は, CL のスペクトル特性は活性酸素種ではなく化合物の骨格により異なることを示唆している。

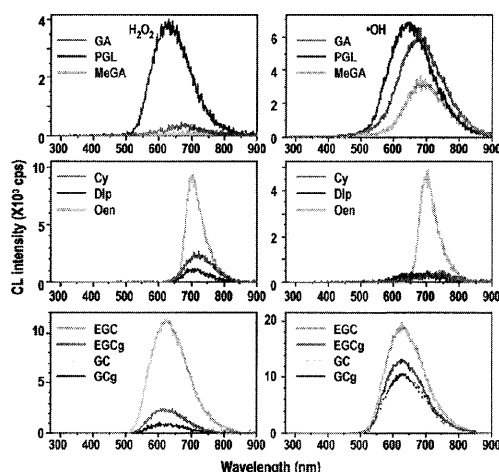


図 2 ガレート類, アントシアニン類, カテキン類の XYZ 系 CL スペクトル

V. まとめ

本研究では, 1) XYZ 系における抗酸化物質の物質的变化と活性の変動, 2) CL を生成しないビタミン類, 3) 化合物の基本骨格による CL スペクトルの違いが明らかとなった。以上より, CL 生成における Y の役割が明らかになりつつある。今後, Y の物質的变化と CL 変化を検討することで生成メカニズムを解明する。

VI. 参考文献

- 1) K.Iwai, K.Abe, S.K.Chung, H.Matsue: Food Sci. Biotechnol., 10, 513-520, 2001.
- 2) K.Iwai, M.Sato, H.Matsue: Food Sci. Biotechnol., 10, 508-512, 2001.
- 3) 吉城由美子, 大久保一良: 化学と生物, 35, 111-115, 1997.
- 4) K.Iwai, A.Onodera, H.Matsue: Int. J. Food Sci. Nutr., 50, 443-451, 2001.

- 5) K.Iwai, N.Nakaya, Y.Kawasaki, H.Matsue: J. Agric. Food Chem., 50, 3592-3596, 2002.
- 6) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木柁吉: 日本食品工業学会誌, 41, 611-618, 1994.