

## 電子スピン共鳴法

### 5. 食品の活性酸素（スーパーオキシド）消去能の測定

#### Electron Spin Resonance Spectroscopy

#### 5. Measurement of Active Oxygen (Superoxide Ion) Scavenging Activity of Foods

##### 1. はじめに

活性酸素が老化の促進や種々の病気の発症にかかわることが知られている。この活性酸素から身体を守るためには、抗酸化性食品を摂取することが有効であり、これまで多くの食品や抗酸化物質の抗酸化能が測定されてきた。本稿では、本シリーズ2回目に述べたESRスピントラップ法を応用したスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 消去能評価法を紹介する。

##### 1. $O_2^-$ 消去能評価法の原理

本法は、スピントラップ法を基本として、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) に対するスピントラップ剤 DMPO と試料（抗酸化剤）との競争反応を利用する方法である。原理を図1に示す。

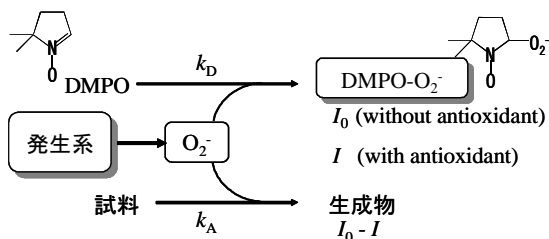


図1. 競争反応を利用する試料の抗酸化能評価法の原理

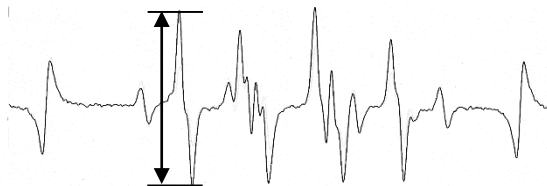


図2. 電解生成スーパーオキシドを使用した場合の  $DMPO-O_2^-$  の ESR スペクトル。スペクトルの両端の信号はマンガンマーカである。抗酸化能評価には、矢印で示す信号の強度を  $I_0$  または  $I$  として用いる。

最初に、試料は含まれない系で発生させた  $O_2^-$  を DMPO と反応させた後、生成した DMPO

アダクト ( $DMPO-O_2^-$ 、ESR 検出が可能) の ESR スペクトル (図 2) を測定して、信号強度 ( $I_0$ ) を求める。つぎに、試料を DMPO と共存させて  $O_2^-$  と反応させる。 $O_2^-$  に対して DMPO と試料が競争反応を起こすため、試料の抗酸化能に応じて  $DMPO-O_2^-$  の量が減少する。このときの信号強度を  $I$  とすれば、式(1)の関係が成立する。

$$I_0/I - 1 = (k_A[\text{Sample}]) / (k_D[\text{DMPO}]) \quad (1)$$

ここで、 $k_D$  および  $k_A$  は、 $O_2^-$  に対する DMPO および試料の二次反応速度定数であり、 $[DMPO]$  および  $[Sample]$  はそれぞれ DMPO と試料の濃度 (mol/L) である。試料が純物質の場合、DMPO の二次反応速度定数 ( $k_D=30 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (pH=7.4)) を用いて、式(1)から試料の二次反応速度定数  $k_A$  を求めることができる。一方、食品のような複合系の場合、標準試料であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を用いてあらかじめ検量線を作成し、試料 1 g 当りあるいは 1 mL 当りの SOD 換算値 (U/g または U/mL、U は酵素の活性を示す単位；ユニット) を求め、その値を消去活性値とする。

##### 2. 従来の $O_2^-$ 消去能評価法の欠点

図1の方法には、実は大きな欠点がある。第一は、試料中の成分が基準となる  $O_2^-$  発生系を阻害し、所定量の  $O_2^-$  を発生させない場合である。従来、基準となる  $O_2^-$  発生系としてヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (HPX-XOD) 系が多用されている。しかし、試料成分が酵素 XOD を阻害する場合、所定量の  $O_2^-$  が生成されないため、 $DMPO-O_2^-$  の量が減少する。その結果、試料があたかも  $O_2^-$  を消去したかのような評価を下すこととなる。第二は、 $DMPO-O_2^-$  が試料成分によって還元を受ける場

合である。たとえば、アルコールビン酸が含まれている場合が該当する。この場合も  $O_2^-$  発生系阻害と同様に、消去能を過大評価することとなる。これを改善するために、筆者らは以下に述べる方法を考案した。

### 3. 電解生成スーパーオキシドを用いる方法

$O_2^-$  発生を阻害しない系として、無水ジメチルスルホキシド (DMSO) 中の酸素ガスの定電位電解で得た  $O_2^-$  溶液を使う方法である。また、観測される DMPO- $O_2^-$  の ESR 信号強度の時間変化を追跡し、時間ゼロすなわち  $O_2^-$  の DMSO 溶液と試料溶液を混合した直後の信号強度を見積もることで、DMPO- $O_2^-$  の還元などの後続反応の影響を除外する方法である。概略を以下に記す。

支持電解質として 0.1 M テトラブチルアンモニウムテトラフルオロホウ酸塩を含む無水ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液に、酸素ガスを通気しながら、炭素電極を作用極とする 3 電極方式により、-1.2 V vs.aq.SCE で約 30 分から 1 時間定電位電解を行う。我々のシステムでの  $O_2^-$  濃度は約 0.5 mM-1 mM であった。ただし、DMSO 中の  $O_2^-$  の安定性は約 1 時間程度であったので、この時間以内で測定を終了する。

マイクロテストチューブ中で、0.1 M リン酸塩緩衝溶液 (PBS, pH7.4) または試料を含む PBS 溶液と DMPO 原液 (9.2 M) を混合する。次いで  $O_2^-$  の DMSO 溶液を加え、計時を開始する。ペリスタポンプにより ESR 装置の共振器内にセットした水溶液セルに反応液を送り、ESR スペクトルの測定を行う。このとき、図 2 中に矢印で示した DMPO- $O_2^-$  の信号強度の時間変化を約 2 分間追跡する。DMPO- $O_2^-$  の ESR 信号強度は、試料の有無に関わらず一次反応速度式に従って減少するので、この速度式から時間ゼロにおける信号強度を推定し、これを後続反応の影響が含まれていない ESR 信号強度として用いる。

この方法では、有機溶媒 DMSO が使われているため、 $O_2^-$  と DMPO の二次反応速度定数が不明である。したがって、標準物質 SOD を用いて、あらかじめ SOD 検量線を作成して、試料の抗酸化能を SOD 換算値として表示する方

法がとられる。

図 3 に、植物性食材 (生食 1 g 当たり) および飲料 (1 mL 当たり) の  $O_2^-$  消去能を示す。SOD 換算値が大きいほど、消去能が高いことを示している。値の違いはポリフェノール量の差に起因していると考えられている。日常の食事法の参考にしてほしい。

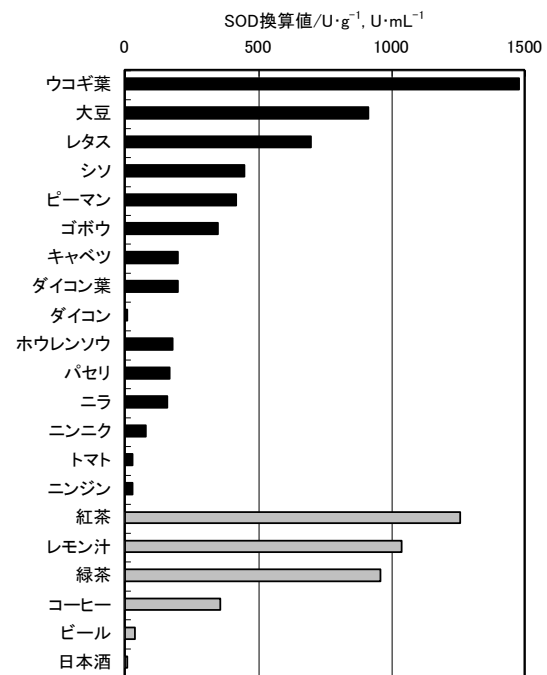


図 3. 植物性食材と飲料の SOD 換算値

ビールと日本酒では、ビールの活性が大きい。抗酸化物質は麦芽や胚芽に多く含まれている。麦芽すべてを使って醸造するのがビールで、胚芽をすべて削ってしまうのが日本酒である。皆さんはどちらがお好きですか？

本紀要は、本校の教員が実践力のある技術者や経済人を地域に送り出すため、日ごろ行っている教育研究活動の一端を纏めたものである。これらの情報は、教員のお互いを理解し次の展開を進めるための糧となるだけではなく、多くの皆様に読んでいただくことによって、本校の教育研究活動をご理解いただくのみならず、皆様と本校教員との共同研究・技術相談などが、今後より一層推進されることを期待している。

山形県立産業技術短期大学校庄内校  
校長 尾形 健明