

ESR(電子スピン共鳴)による食品等の抗酸化能測定プロトコール開発

江 本 匡 [株式会社エコニクス技術開発部/統括マネージャー]

多 田 憲 司 [株式会社エコニクス技術開発部研究開発チーム/チーフコンサルタント]

高橋 かおり [株式会社エコニクス技術開発部研究開発チーム/アソシエイト]

藤 井 博 匡 [北海道公立大学法人札幌医科大学/教授]
郡 俊 志 [北海道公立大学法人札幌医科大学/研究員]

背景・目的

「抗酸化能」は様々な疾病の原因となる「酸化ストレス」の抑制力として、健康維持・予防医学の観点から注目されている。抗酸化能の効果を謳った食品や機能性食品、化粧品等の市場は拡大傾向にある一方で、抗酸化能の測定、評価方法は統一されていない。

ESR(電子スピン共鳴)による抗酸化能測定は、試料形態や特性に左右されない精度の高い測定が可能であるが、複雑な操作・ノウハウを必要とする。本研究は研究協力機関が開発した ESR 装置による安定的な抗酸化能測定技術を用いた簡易で迅速な抗酸化能測定・評価プロトコール開発を目的とする。

内容・方法

新規 ESR 技術を用いた抗酸化能測定について、パラメーターの検討と適用例を蓄積し、受託分析事業化のための測定・評価プロトコールの開発を行った。

新規 ESR 技術を用い、スピントラップ剤(CYPMPO)を使ってペルオキシラジカル、アルコキシラジカル、スーパーオキシドアニオンラジカルを対象とした代表的な抗酸化物質(トロロックス)の抗酸化能測定を行い、再現性や濃度依存性から測定条件の最適化を行った。この測定条件において他の方法では測定が難しいとされる着色試料や濁りのある試料について抗酸化能を測定した。固体試料については異なる溶媒から調整した2種類の抽出液について抗酸化能を測定した。

これら測定結果について、再現性と濃度依存性の確認、トロロックス当量に換算した値と対象ラジカル種の違いについて比較をした。得られた抗酸化能について、ORAC 法や他社 ESR 法と比較し互換性についても検討を行った。また、測定試料に含まれる代表的な機能性物質の含有量を測定し、抗酸化能測定結果とあわせ比較した。

結果・成果

最初に、目的とした3種類のラジカルを光照射のみで安定して発生させること、そして発生させたラジカルを対象としたトロロックスの抗酸化能を安定して測定できる実験条件について検討した。

当初、ラジカル発生条件として2種類の光照射パターンを用いた測定を行っていた。発生ラジカルからの ESR 信号が大きく測定誤差が大きくなってしまうことや、評価できる抗酸化能範囲が狭いなどの課題が見つかった。そこで、光照射条件や測定試料の調製試薬濃度を変えることにより、測定範囲は妥当なものに改良できたが、繰り返し測定精度のよいデータを得ることはできなかった。このばらつきについては、光照射の際の照度のばらつき、測定用セルの品質、試料調製による誤差などが想定された。検討を行った結果、データのばらつきを小さくするには、測定試料の正確な調製がきわめて重要であり、試薬は数 μL の微量な扱いとなるので操作の正確さが求められることがわかった。繰り返し精度として、5 点の測定値において変動係数が5%以下となるデータが得られるようになり、これを技術的な指標とすることにした。

次に、ラジカル消去能のトロロックス濃度依存性についての確認を行った。「消去されたラジカル量」と「消去されずに残ったラジカル量」の比率はトロロックス濃度と比例する関係にある。この比例関係について、対象とした全てのラジカル種の実測値における比例関係は、近似線形決定係数で0.9以上を得ており、ラジカル消去能に対するトロロックス濃度依存性について確認ができた。直線の傾きについても測定の再現性は良好であった。

液体サンプルとして用いた牛乳および缶コーヒーにおいても繰り返し精度、濃度依存性を確認した。また、各測定結果から抗酸化能のトロロックス当量を算出した。固体サンプルにはタマネギとダッタンそば粉を用いた。タマネギはスライスして凍結乾燥したものを乳鉢で粉末化した。粉末サンプルをそれぞれリン酸バッファーとアセトニトリルで抽出しこの二種類の抽出液について抗酸化能を測定した。これも繰り返し精度と濃度依存性を確認し、得られた測定結果から抗酸化能のトロロックス当量を算出した。

全てのサンプルにおいて、スーパーオキシドアニオンラジカルに対し高い抗酸化能が示された。タマネギ、ダッタンそば粉とも、対象とした全てのラジカルにおいて、リン酸バッファーにより抽出した試料の抗酸化能はアセトニトリルで抽出した試料の抗酸化能よりも高い値を示した。ORAC 法や他社 ESR 法による抗酸化能評価との比較において相関は得られなかった。機能性成分測定と比較した結果、成分濃度と抗酸化能の間に相関はなかった。

今後の展望

ESR 装置を用いた抗酸化能評価の事業化にむけ、より多くのデータ蓄積が必要である。性質の異なる試料について、本研究で開発したプロトコールによる抗酸化能測定を行い、結果の検討を重ねていく。前処理や抽出方法について抗酸化能測定に最適な方法の選択が必要である。

計測装置については、チューニングや試料添加の過程が自動化されるとより効率的に精度の高い測定が可能となり、計測の低コスト化に繋がる可能性がある。

測定方法による抗酸化能評価の差異については、各測定方法の特徴が明確になり、将来的には目的に応じた抗酸化能評価が可能となることを期待している。