

<平成22年度助成>

食品の抗酸化能を評価する簡便な測定手法の開発

山田 健一

(九州大学大学院薬学研究院)

目 的

生活習慣病である高血圧や、糖尿病、動脈硬化などの原因のひとつとして、活性酸素・フリーラジカルの関与が報告されている¹⁾。食品中には、この消去作用を有する抗酸化物質が数多く存在することなどから注目され、生活習慣病の予防などに向け、その探索や効能評価などの研究が盛んに進められている。抗酸化物質は、主に酸化還元を反応機構として、機能を発揮する。そのために、アスコルビン酸の測定法でも、酸化還元反応をもとに、定量が試みられている。しかしながら何れも、簡便性、感度などの点で克服すべき点がある。一方で、常磁性化合物であるニトロキシドは、酸化・還元の両方を受け得るユニークな酸化還元特性を有し、生体レドックス変動などを捉えることが可能である。しかしながら、ニトロキシドを介した間接的な測定となるため、ニトロキシドの酸化還元特性が検出そのものに大きく影響する。そのため我々は、最近ピペリジン系ニトロキシドの2,6位周囲を容易に変換できる合成を開発し²⁾、酸化還元電位が変動する可能性を示した³⁾。そこで本研究では、「物理化学的論理をもとに、抗酸化能を評価する新たな検出手法の開発」を目的として、以下3点を実施項目とした。

- 1) 物理化学的論理に基づく反応性を制御した検出化合物の合成
- 2) スピン-蛍光相互作用に基づく新たな検出手法開発
- 3) 蛍光ニトロキシド化合物を用いた評価

方 法

2,6位置換ピペリジン系ニトロキシドの合成法開発

我々が開発した合成手法²⁾に従い2,6位置換ピペリジン系ニトロキシドを合成した。具体的には、ピペリドンに3等量のcyclohexanone、6等量のNH₄Clを加え、DMSO溶媒中、60℃で反応を行った。

酸化還元電位の測定

各種ニトロキシド2 mM溶液(PBS;pH 7.4)を、アルゴンガスによる脱気を行った後、ALS 660C電気化学アナライザー(BAS)を用いて、室温下(ca. 25℃)、走査速度0.1 V s⁻¹で測定した。作用電極：グラッシーカーボン電極(φ 1mm)、参照電極：Ag/AgCl電極、参照電極：白金電極。

反応性評価

ニトロキシド50 μM溶液(PBS;(pH 7.4, 100 μM DTPA))とSodium L-ascorbate 2 mM溶液(PBS(pH 7.4, 100 μM DTPA))溶液を等量混合し、素早く石英ガラス製キャピラリーに一定量採取し、ESRスペクトルを25℃で測定した。アスコルビン酸が大過剰に存在する場合、反応は擬一次反応に従うとして、反応速度定数を算出した。

蛍光測定

ニトロキシド5 μMまたは50 μM溶液(PBS;pH 7.4, 1% DMF)の吸光スペクトル、蛍光スペクトルをSH-9000(コロナ電気)にて測定した。

実験動物

アスコルビン酸合成能欠損動物であるODSラット(ODS/Shi Jcl-od/od、雄性)は、日本クレアより購入した。餌としてアスコルビン酸を含ま

ない飼料を摂取させ、成長に障害を与えない最低必要量のアスコルビン酸量 (1g/L) を飲料水に溶かし与えた。アスコルビン酸欠乏ラットは、給水によるアスコルビン酸供与を中止することにより作成した。

結果・考察

1. 物理化学的論理に基づく反応性を制御した 検出化合物の合成

既報²⁾に従い、2,6位置換ピペリジン系ニトロキシドを合成した。本研究で使用した代表的な化合物 1-3 を図1に示す。

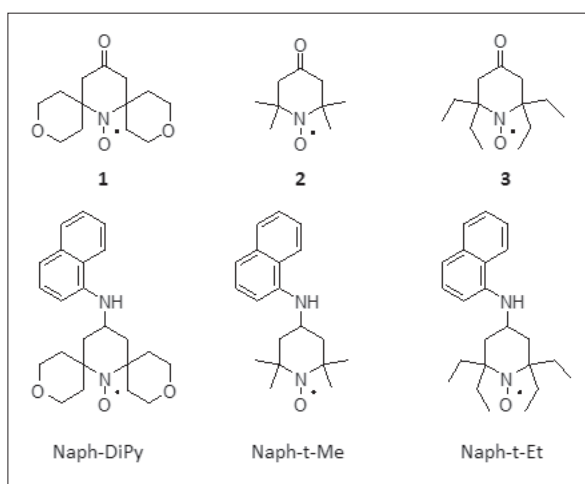


図1. 本研究で使用した代表的なニトロキシド化合物と
蛍光ニトロキシド

次に、2,6位置換基による酸化還元特性への影響を調べるため、サイクリックボルタメトリー (CV) を用いて酸化還元電位を測定した。化合物 1, 2, 3 のサイクリックボルタモグラムから、ピペリジンニトロキシドの2,6を置換することで、酸化還元電位が大きく変動した(図2A)。そこで、代表的な還元物質であるアスコルビン酸とニトロキシドとの反応性を評価するために、ニトロキシドの常磁性消失速度を、電子スピン共鳴装置を用いて測定した。その結果、2,6位置換に応じて、アスコルビン酸との反応性が大きく変動した (data not shown)。ニトロキシドは、アスコルビン酸と反応し還元されヒドロキシルアミン体にな

る。そこで、ヒドロキシルアミンとのレドックス対における酸化還元電位と反応速度定数をプロットした結果、約 0.06 V の酸化還元電位を境にして、これより正方向の酸化還元電位を持つ化合物はアスコルビン酸と反応し、一方、0.06 V より負方向の電位を持つ場合は、アスコルビン酸との反応性が低いことがわかった(図2B)。さらに、アスコルビン酸とのギブズエネルギー変化量 (ΔG) を算出した結果、 ΔG の値が 0 を境にして、 $\Delta G > 0$ では、アスコルビン酸による還元をほとんど受けないのに対して、 $\Delta G < 0$ では、アスコルビン酸と非常によく反応した(図2C)。この反応ギブズエネ

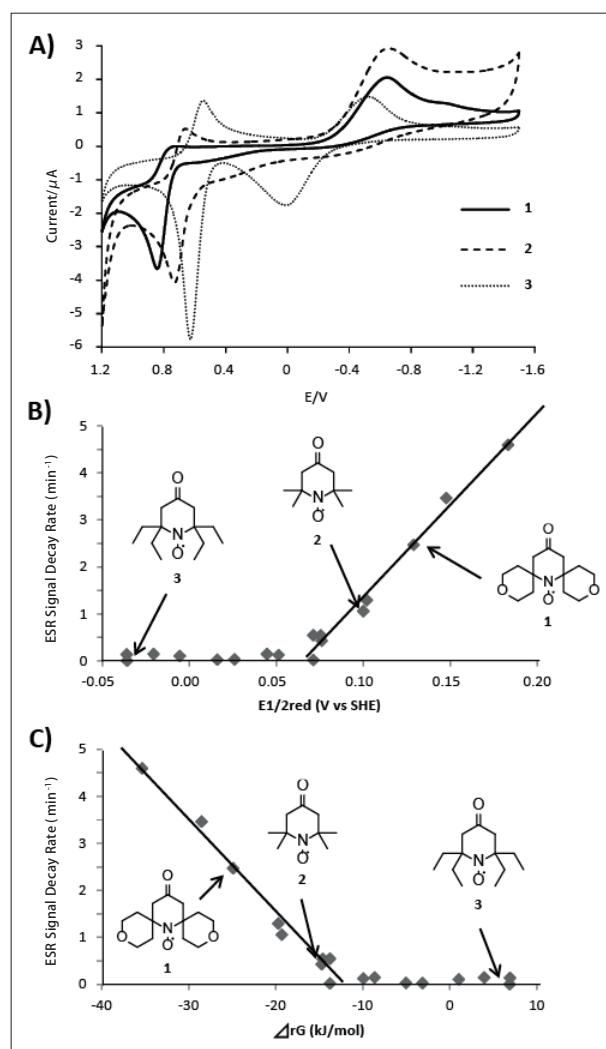


図2. ニトロキシドの電気化学的特性。A) サイクリックボルタモグラム。作用電極：グラッシーカーボン電極、参照電極：Ag/AgCl 電極、補助電極：白金電極。B) 2,6位置換ピペリジン系ニトロキシドのアスコルビン酸に対する擬一次反応速度定数と酸化還元電位。ニトロキシドと過剰量のアスコルビン酸との反応を ESR により経時的に測定した。C) ニトロキシドのアスコルビン酸に対する擬一次反応速度定数と反応ギブズエネルギー

ルギー変化量は、その反応が自発的に起こるかを示す指標であることから、ニトロキシドの酸化還元電位から ΔG を求めることによって、アスコルビン酸による還元が起こるかを予測できることを見出した。しかしながら、ギブズエネルギー変化量は熱力学的状態量であるため、直接反応速度とギブズエネルギーを比較することはできない。そこで、アレニウスプロットから反応の活性化エネルギーの測定を行った結果、 $\Delta G < 0$ のニトロキシドは、活性化エネルギーと反応速度定数間で良好な相関が得られた (data not shown)。

以上の結果より、ニトロキシドの2,6位を置換することにより酸化還元電位が変化し、代表的な還元物質であるアスコルビン酸との反応性を物理化学的指標であるギブズエネルギーで正確に説明することに成功した。

2. スピン-蛍光相互作用に基づく新たな検出手法開発

ピペリジン系ニトロキシドの2,6位置換基により酸化還元電位を制御でき、それに応じて反応性が変化することを示した。そこで、より簡便な測定手法の開発を目指し、蛍光物質が不対電子存在下消光反応を引き起こすことに着目した(図3)。すなわち、蛍光ニトロキシドを合成した場合、ラジカルが存在しているとPeT効果により蛍光が消光する。しかし、ニトロキシドが酸化還元反応を受け、常磁性が消失すると、消光作用が解除さ

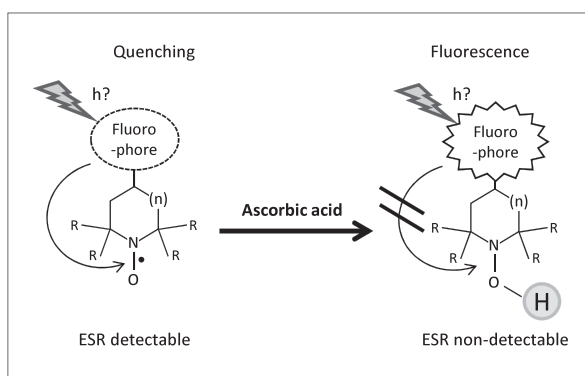


図3. 検出原理。電子スピンと蛍光団の消光反応 (Photo-induced Electron Transfer : Pet) を利用。アスコルビン酸により還元されると不対電子が消失し蛍光を示す

れ蛍光発光が観測される。これまでもこの原理を利用して、アスコルビン酸⁴⁾やレドックス変動⁵⁾の検出開発が進められてきた。しかし、いずれもニトロキシドの>N-O周囲の置換基がメチル基であり、反応特異性や感度、物理化学的な論理構築の面で満足できるものではなかった。そこで、酸化還元電位の異なる3つのニトロキシドを選択し、図1に示す蛍光ニトロキシドを合成した。その結果、アスコルビン酸との反応ギブズエネルギーが正である化合物3を用いた蛍光ニトロキシド Naph-t-Et では、蛍光強度が全く上昇しないのに対し、反応ギブズエネルギーが負である化合物1の蛍光物質 Naph-DiPy では、アスコルビン酸添加後、蛍光強度が有意に上昇した(図4)。

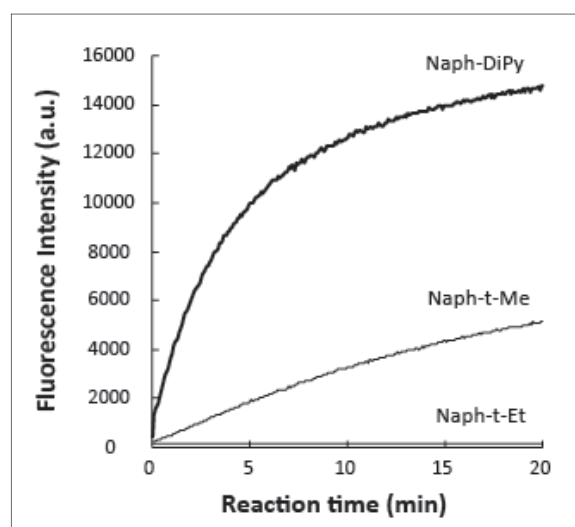


図4. 蛍光ニトロキシドとアスコルビン酸との反応。
Ex: 310 nm, Em: 430 nm

さらに、Naph-DiPyでは、アスコルビン酸濃度に応じて、その常磁性が消失し(図5A)、それに伴い蛍光強度が上昇した(図5B)。ここで、ニトロキシドとアスコルビン酸との反応は、下記式のように2:1で反応することが報告されている⁶⁾。

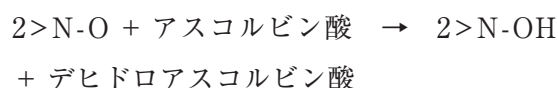


図5の結果より、Naph-DiPyとアスコルビン酸との反応もほぼ2:1となり、化学量論的に正しく反応していることがわかる。また、これまで最

も信頼の置ける測定手法として用いられている HPLC 法と比較した場合、蛍光ニトロキシドの常磁性消失と蛍光強度の上昇が、非常によく相関することもわかった(図 5C)。

一方、既存のニトロキシド化合物は、他の還元物質や酸化物質とも反応することが報告されている⁶⁾。特に、 $O_2^{\cdot -}$ など活性酸素と反応しオキソアンモニウムカチオンに酸化されるとの報告がある。そこでこれら物質と Naph-DiPy との反応性を測定したところ、GSH や Bilirubin などの

還元物質や、 $O_2^{\cdot -}$ や H_2O_2 などの酸化剤とはほとんど反応しないことがわかった(図 6A,B)。さらに、現在広く利用されているアスコルビン酸の簡便な測定手法である 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) 法では、アスコルビン酸以外にグルタチオンなども反応する(図 6C)。以上の結果より、Naph-DiPy は、アスコルビン酸に対して特異的に反応し、また非常に簡便に短時間で測定できる新たな検出手法であることがわかった。

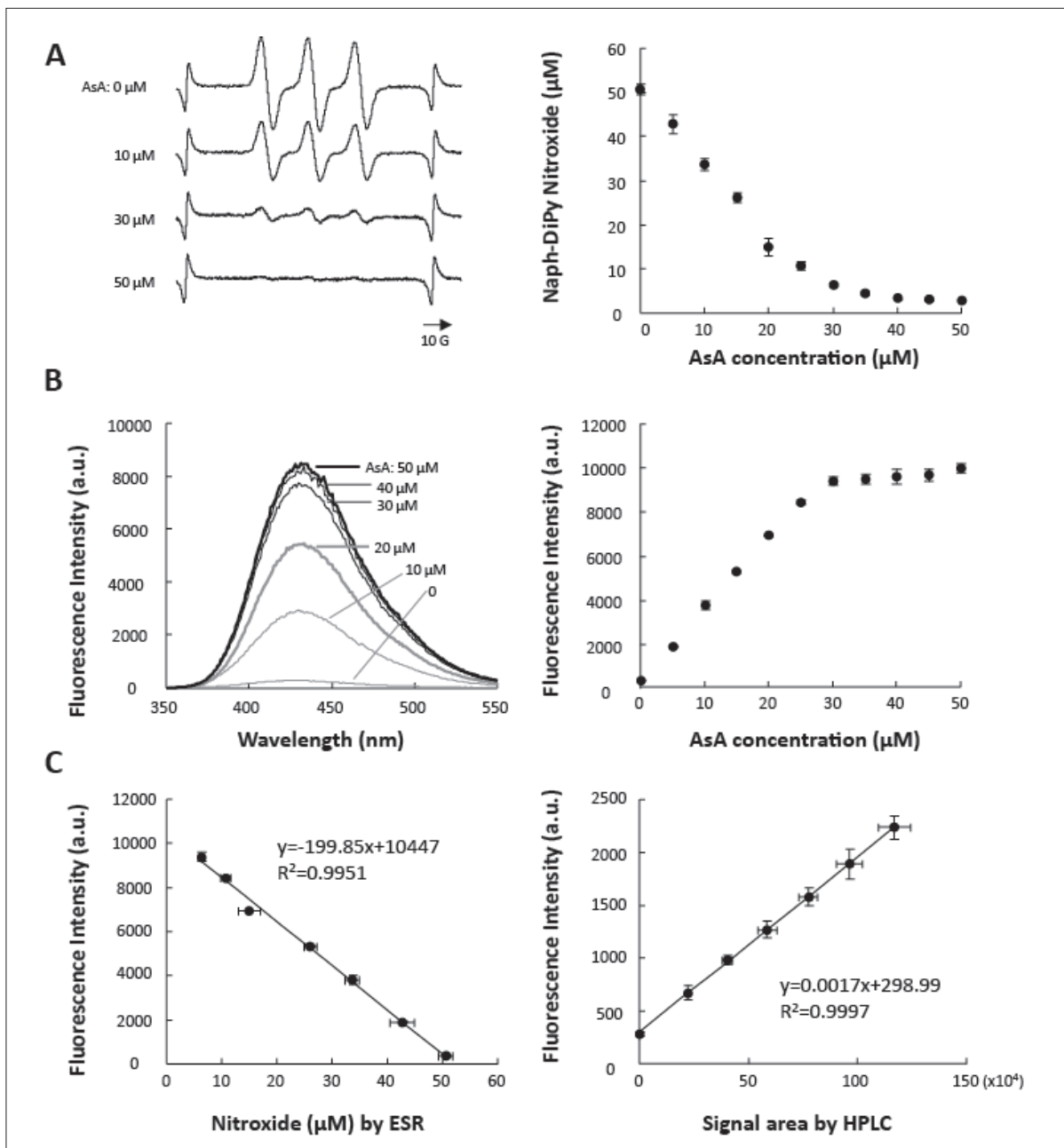


図 5. アスコルビン酸添加後の Naph-DiPy の A) ESR シグナル減衰と B) 蛍光強度変化。C) Naph-DiPy の ESR シグナル強度と蛍光強度変化、あるいは Naph-DiPy 蛍光強度変化と HPLC 法との比較

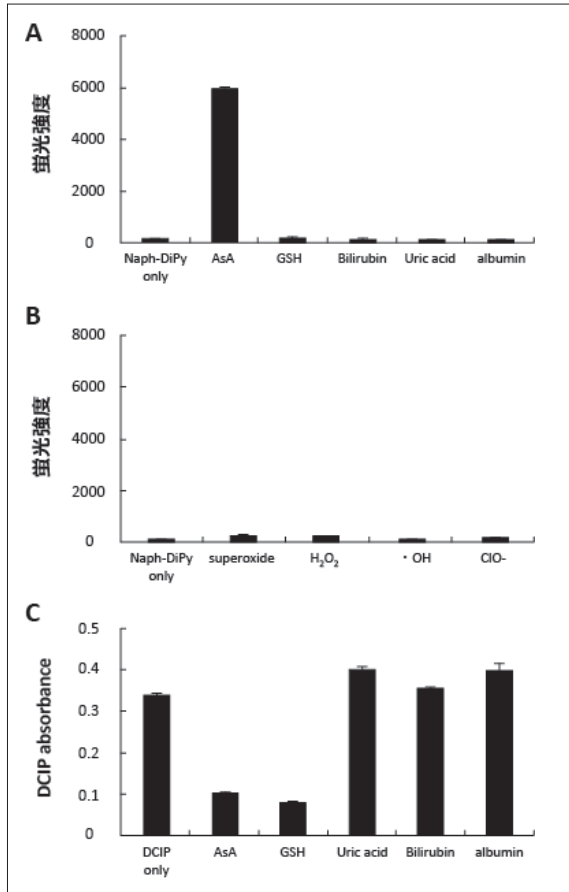


図6. Naph-DiPyとA)還元物質、B)活性酸素種との反応性。C)DCIPを用いたアスコルビン酸や還元物質との反応性

3. 蛍光ニトロキシド化合物を用いた評価

次に、蛍光ニトロキシドが実際に多くのモデル系に使用できるか否か確認する上で、最も夾雑物が多い血液を用いて検討した。ここで用いたODSラットは、アスコルビン酸合成能を欠損しており、外来的にアスコルビン酸を与えない場合、生体内アスコルビン酸量は減少し、生後15-20日齢より、体重増加抑制、後肢の短縮や開閉異常、歩行異常といった症状が発症する。これらの症状は、アスコルビン酸の経口投与、あるいは飲水中にアスコルビン酸を添加することにより抑制される。したがって、アスコルビン酸の投与量や投与日数を調節することで、生体内アスコルビン酸量を変化させることが可能である。はじめに、ラット血漿中のアスコルビン酸を正しく測定できるか否か検討した。アスコルビン酸の還元体であるデヒドロアスコルビン酸は、グルタチオン

やNADHによりアスコルビン酸に酵素的に酸化される。そこで、これら基質の影響を検討したところ、いずれも基質添加でも蛍光強度に変化なく、本化合物は血漿中でも正しくアスコルビン酸を測定できることがわかった(図7A)。そこで、本手法をODSラット血漿に適用した。その結果、ODSラットの血漿中アスコルビン酸濃度は経日的に減少するのに対し、アスコルビン酸添加水の飲水により、ODSラット血漿中アスコルビン酸濃度は一定に保たれていることが、Naph-DiPyの蛍光強度変化より簡便に測定できた(図7B)。さらに、Naph-DiPyを用いた蛍光測定とHPLC法を比較したところ、非常によく相関し、本手法は血漿など夾雑物が多い条件下でも、正しくアスコルビン酸を測定できることがわかった(図7C)。

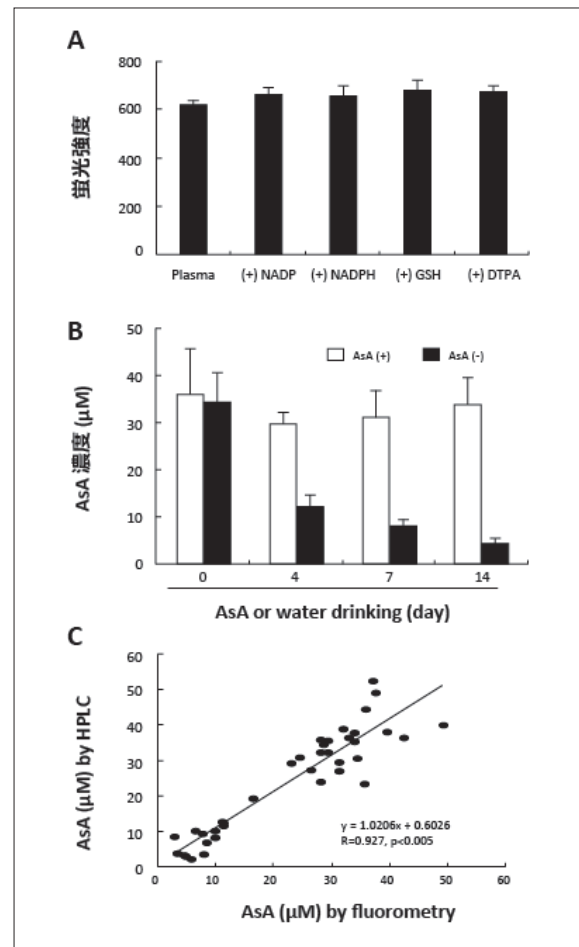


図7. A)種々の基質を添加した血漿中、あるいはB)ODSラット血漿中でのアスコルビン酸の測定(Naph-DiPyを用いて)。C)ODSラット血漿中でのアスコルビン酸濃度を、Naph-DiPyとHPLC法を用いて比較

まとめ

以上の結果より、ペペリジン系ニトロキシド化合物の2,6位を置換することで、酸化還元電位が変化し、アスコルビン酸との反応性をギブズエネルギーなど物理化学的指標により説明できることを見出した。さらに、蛍光団と不対電子との相互作用により消光することに着目し、新たな蛍光ニトロキシド化合物を開発し、アスコルビン酸を簡便に正確に測定できることを示した。また本測定法は、実験動物の血漿という、夾雑物が多い条件下でもアスコルビン酸を測定できた。一方、本手法を市販されているお茶中のアスコルビン酸の濃度測定に適用したところ正しく測定でき、また開封した状態で放置すると、お茶中のアスコルビン酸濃度が低下していた。したがって、本研究で見出したNaph-DiPyを用いることで、動物試料や食料品中のアスコルビン酸濃度を正しく測定でき、酸化ストレス疾患と生体内レドックス変動、あるいは食料品中の抗酸化能測定やアスコルビン酸の安定性試験など、多岐にわたる分野で利用できる可能性が示された。

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(公財)浦上食品・食文化振興財団に心より感謝申し上げます。

〔発表論文〕

Matsuoka Y, Yamato M, Yamasaki T, Mito F, Yamada K. Rapid and convenient detection of ascorbic acid using a fluorescent nitroxide switch. *Free Radic Biol Med.* **2012**, *53*, 2112-2118.

文 献

- 1) G. R. Drummond, S. Selemidis, K. K. Griendling, C. G. Sobey, *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, *10*, 453-471.
- 2) K. Sakai, K. i. Yamada, T. Yamasaki, Y. Kinoshita, F. Mito, H. Utsumi, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2311-2315.
- 3) Y. Kinoshita, K. Yamada, T. Yamasaki, F. Mito, M. Yamato, N. Kosem, H. Deguchi, C. Shirahama, Y. Ito, K. Kitagawa, N. Okukado, K. Sakai, H. Utsumi, *Free Radic Biol Med* **2010**, *49*, 1703-1709. .
- 4) E. Lozinsky, V. V. Martin, T. A. Berezina, A. I. Shames, A. L. Weis, G. I. Likhtenshtein, *J Biochem Biophys Methods* **1999**, *38*, 29-42.
- 5) B. J. Morrow, D. J. Keddle, N. Gueven, M. F. Lavin, S. E. Bottle, *Free Radic Biol Med* **2010**, *49*, 67-76.
- 6) N. Kocherginsky, H. M. Swartz, in *Nitroxide Spin Labels: Reactions in Biology and Chemistry* (Eds.: N. Kocherginsky, H. M. Swartz), CRC Press, Boca Raton, **1995**, pp. 27-66.

Development of antioxidant detection method in food

Ken-ichi Yamada

*Department of Bio-functional Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences
Kyushu University*

A redox imbalance resulting in elevated levels of reactive oxygen species and accompanied by a decrease in endogenous antioxidants is associated with the pathogenesis of various diseases. Ascorbic acid is a small molecule reductant with multiple functions *in vivo*. Reducing ascorbic acid intake leads to a lack of hydroxylation of prolines and lysines, causing a looser triple helix and resulting in scurvy. Ascorbic acid also acts as an antioxidant to prevent oxidative stress. Because ascorbic acid is related to disease states, rapid and convenient detection of ascorbic acid should be useful in diagnosis and the evaluation of antioxidant content in food.

Nitroxides have great potential advantages as spin probes, antioxidants, contrast agents, and radiation-protecting agents. Also, they are readily reduced by ascorbic acid, and lose their paramagnetic nature. Furthermore, covalent coupling of nitroxide with a fluorophore lead to intramolecular quenching of fluorescence emission by electron exchange interactions.

Here, we have synthesized several nitroxide radicals with different substituents which vary the steric and electronic environment around the N-O moiety and have systematically investigated the role of substituents on the stability of the radicals. Our results demonstrated that the reactivity toward ascorbic acid correlates with the redox potential of the derivatives. Furthermore, we developed a new fluorophore-nitroxide probe, Naph-DiPy nitroxide, for ascorbic acid. Naph-DiPy nitroxide rapidly reacted with ascorbic acid and showed fluorescence enhancement but not in response to other reductants or reactive oxygen species. To confirm the practical usefulness of the fluorophore-nitroxide probe, we demonstrated the use of Naph-DiPy nitroxide for the measurement of ascorbic acid in the plasma of an osteogenic disorder Shionogi rat, when fed an ascorbic acid-deficient diet. The results suggest that this novel fluorophore-nitroxide probe could sensitively and easily detect ascorbic acid and be useful as a tool for the diagnosis of disease states and the evaluation of the antioxidant content in food.