

ESR スピントラップ法によるマヨネーズの初期酸化計測の試み

北海道教育大学・教授 中村 秀夫

■ 緒言

電子スピン共鳴(ESR)法はラジカル種を計測できる。食品中では、活性酸素との反応や加熱、紫外線・放射線照射などの様々な要因で変化する過程で生成し劣化の原因となる。安定な有機ラジカルは直接 ESR 法での計測が可能であるが、不安定な活性酸素種などは直接計測することが難しいことも多い。このような場合には、不安定なラジカルをラジカル捕捉剤で捕捉して安定なラジカルとしてから ESR 計測することが行われている。これが ESR スピントラップ法である。この手法を用いると、試料中に発生する活性酸素種、有機ラジカルの計測が可能となる。そのため酸化の原因となる酸素ラジカル、炭素ラジカルの種類、量の計測も可能となる。酸化により生じている過酸化物質などの量も、ラジカルに変化させることで計測も可能となる。

安定で分解によりラジカル種を発生させないことが知られている CYPMPO がある。これを利用することで水溶液中に生じる活性酸素種を捕捉し、ESR で計測することが可能であり、水溶性成分の抗酸化能の計測が可能となる。申請者も、食品の抽出物のスーパーオキシドラジカルやアルコキシラジカルに対する応答を計測し、抗酸化能を直接計測できることを報告している。しかし、水溶液中でのラジカル捕捉であるため脂質などの脂溶性物質のラジカルの捕捉や、抗酸化能の計測は難しい。

しかし、脂質中で発生する活性酸素種や有機ラジカルを捕捉し計測することは、マヨネーズの品質管理上きわめて重要である。

そこで申請者は、

- ・スピントラップ剤 CYPMPO ならびにさらにの脂溶性を高めた誘導体である DB-CYP の合成、性質の検討
- ・スピントラップ剤 CYPMPO、DB-CYP を用いたトリアシルグリセロールの初期酸化において発生するラジカルの捕捉の検討
- ・アルコキシラジカル、ヒドロキシラジカル、ペルオキシラジカルの水溶性物質・脂溶性物質共存下でも、測定可能なプロトコルの開発の検討
- ・トリアシルグリセロールの酸化過程で生じるラジカルのスピントラップ実験を行った。

■ 実験方法・結果・考察

実験の性質上、実験方法・結果・考察を分けて記述すると分かりにくくなるため、まとめて記述する。

比較的新しいスピントラップ剤である CYPMPO (25mg、35,000 円) は PBN (1g、5,000 円)、DMPO (1g、18,000 円) と比較して高価である。CYPMPO 誘導体の合成する目的もあるので市販されている CYPMPO の合成の検討も行った。さらに、CYPMPO 誘導体として新規の高い脂溶性を有するスピントラップ剤として DB-CYP、CYP-Ph の合成を行った。

【CYPMPO 合成】CYPMPO は参考文献(1)の手法では再現性が低く収率がきわめて低収率のため、若干の改良を加えて合成をした。そのポイントは以下の通りである。

環状リン化合物 **4a** は市販品であるが誘導体合成のためにマロン酸エステル **2a** を LiAlH_4 で還元してジオール **3a** とし、さらに三塩化リン・エタノールと反応させ合成した。環状リン化合物 **4a** は酸性条件、加熱条件(200°C)でも分解しなかった。ただし、水とは反応し容易に分解した。この環状リン化合物 **4a** と環状イミン **5a** と反応させて得られるアミン **6a** を酸化して CYPMPO とした。その際、文献(1)の条件である mCPBA では 50%程度の収率で CYPMPO は得られるが、低温(-60°C程度)と保つことと、過剰な酸化が進行するため安定した収率とはならなかった。それに対して、オキサジリジン型酸化剤 PSPO では室温で反応が行え、過剰な酸化が進行せず、収率も 60%程度、またタングステン酸ナトリウムと過酸化水素(室温)の条件でも低収率ながら安定して CYPMPO が得られた。これらの手法は、有機合成を専門としない 4 年生でも実施する事が出来る方法である (Scheme 1)。

【DB-CYP の合成】脂溶性を向上させた誘導体である DB-CYP も上記方法に準じて行った。ジオール **3b** は市販されていないためジブチルマロン酸エステル **2b** を LiAlH_4 で還元して合成した後、三塩化

リン・エタノールと反応させ環状リン化合物 **4b** とした。さらに、これと環状イミン **5a** を反応させアミン **6b** を得た。反応させアミン **6b** は PSPO で酸化して DB-CYP を合成した。DB-CYP も CYPMPO と同様に結晶化または、トリエチルアミン処理したシリカゲルを用いたクロマトグラフィーで精製した (Scheme 2)。

【CYP-Ph の合成】CYP-Ph は環状イミン **5b** を市販のケトン **7** から合成し、環状リン化合物 **4a** と縮合、さらに酸化して合成する事が出来た (Scheme 3)。

この手法により CYPMPO および DB-CYP については安定して十分な量の合成が可能となった。

【CYPMPO 誘導体の諸性質】合成した CYPMPO、DB-CYP、CYP-Ph の分配係数 (n-octanol/water) を計測したところ、CYP-Ph で CYPMPO の約 40 倍、DB-CYP で約 240 倍と CYPMPO よりも脂溶性が格段に向上した (Table 1)。

この3種類のスピントラップ剤を用いてアルコキシラジカル、メチルラジカル、ヒドロキシラジカルのスピントラップ測定を行ないアダクトの ESR 信号を計測した。ESR 測定は、X-band CW-ESR (JEOL) を使用した。アルコキシラジカルの発生系は、AAPH (1mM)、スピントラップ剤 (10mM)、超純水、PB (リン酸緩衝液) (pH7.4, 40mM) の混合液に 5 秒 UV 照射とした (Fig. 1)。ヒドロキシラジカルの発生系は、H₂O₂ (0.25%)、DTPA (1.5mM)、スピントラップ剤 (10mM)、超純水、PB (pH7.4, 25mM) に 5 秒 UV 照射とした (Fig. 2)。メチルラジカルの発生系は、H₂O₂ (0.25%)、DTPA (1.5mM)、スピントラップ剤 (10mM)、L-ascorbic acid (1.25mM)、PB (pH7.4, 25mM) に 5 秒 UV 照射とした (Fig. 3)。

DB-CYP の信号形はいずれのラジカルも CYPMPO と同じ信号形であることがわかった。CYP-Ph の信号形はいずれも CYPMPO とは異なった。また、ヒドロキシラジカルのアダクトがほとんど観測されなかった。

また、合成した CYPMPO、DB-CYP、CYP-Ph のアルコキシラジカル (RO \cdot)、ヒドロキシラジカル (HO \cdot)、メチルラジカル (CH₃ \cdot) のスピンアダクトの半減期も ESR 計測した。いずれを 10 数分程度であり、スピントラップ実験では安定性を有していることが分かった (Table 2)。

DB-CYP と CYPMPO のアダクトの信号形が同じであること、CYP-Ph では捕捉出来ないラジカル種 (HO \cdot) があることから、CYPMPO および DB-CYP が有用であると判断した。

CYPMPO、DB-CYP を用いて AAPH から発生したアルコキシラジカルの捕捉能および標準抗酸化物質の影響を脂溶性成分も多く含む小柴胡湯 (W05)、辛夷清肺湯 (N104)、桂枝人参湯 (T82) の漢方エキス剤を用いて調べた。水溶性の標準抗酸化物質の影響は水溶性の高い CYPMPO で高く出たのに対して、脂溶性の高い抗酸化物質 (GSH) では DB-CYP が高い効果を示した。このことは脂溶性の高い DB-CYP のほうが脂溶性成分の抗酸化効果を効率的に見ることができることを示している (Fig. 4,5)。

【脂溶性成分を対象としたスピントラッププロトコルの開発の検討】

有機溶媒・水混合系でのスピントラッププロトコルの検討を行った。水のみ系では、スピントラップ剤、測定試料成分ならびにラジカル発生条件の脂溶性によりラジカルの捕捉能が大きく異なる。また、マヨネーズのようなエマルジョンの系でも使用可能な、測定系が均一となるような条件でのスピントラップ法の検討を行った。発生させるラジカルは脂肪酸・油脂での発生が想定されるアルコキシラジカル、ペルオキシラジカル、アルキルラジカル、ヒドロキシラジカルを発生させた。スピントラップ剤としては CYPMPO、DB-CYP を用いた。使用する溶媒として、水と自由に混合するアセトニトリル、アセトン、メタノール、エタノール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルホルムアミド (DMF) などを用いた。

有機溶媒と水の混合比を水：有機溶媒 = 60:40 から 70:30 の割合で試料を調製してスピンアダクトの ESR を計測した。その結果は、アセトニトリルではいずれのラジカルでも水だけの系と同じ信号を与え、信号強度もほど同程度であることが分かった。(Fig. 6-8)

また、AIBN (azoisobutyronitrile) から発生するアルコキシラジカルの捕捉実験をアセトニトリル-水混合系、水のみ系で行った。その結果、CYPMPO、DB-CYP でいずれも同じ信号を示した。この信号はヒドロキシラジカルのアダクト信号であり、この結果は CYPMPO 誘導体では、発生したアルキルラジカルは捕捉されないこと、アルキルラジカルが発生してもヒドロキシラジカルが観測されることを示している (Fig. 9)。

なお、エタノール、DMF などでは、水だけの系と有機溶媒との混合系では異なるスピンアダクト信号が ESR で観測された (Fig. 10)。

以上の結果は、油脂等から発生するラジカル種とスピントラップ剤と反応したときの反応性や ESR

信号について検討した結果である。

スピントラップ法では、試料のラジカル消去能(抗酸化能)の計測も可能である。その際のラジカル消去能(抗酸化能)の指標となる標準抗酸化物質の検討も行った。

アルコキシラジカルはGSH(グルタチオン)(Fig. 11)が、ヒドロキシラジカルはアスコルビン酸(Fig. 12)、ペルオキシラジカルは α -リポ酸(Fig. 13)がアダクトの信号強度と物質の濃度に相関がみられ標準抗酸化物質として利用可能であることが分かった。

純粋なトリアシルグリセロール(酸化処理した油脂も含む)中に存在するラジカルもしくはUV照射により発生するラジカルの捕捉実験をCYPMPOおよびPBNを用いて行った。トリアシルグリセロール中には加熱酸化後でもESRで直接計測できるラジカルは残っていない。(Fig. 14b,d)この試料にUV照射するとラジカルが発生してCYPMPOに捕捉されていた。油脂中に紫外線照射によってラジカルを与える化学種、ペルオキシド(-OOH)やエンドペルオキシド(C-OO-C)などが含まれることを示している(Fig. 14a,c)。特にPBNを用いた実験では、この信号強度は時間と共に増加していることが分かった(Fig. 15)。

■ 要 約

以上の結果を要約すると以下ようになる。

- (1) 新規スピントラップ剤DB-CYP, CYP-Phおよび既知のCYPMPOを安定して得ることのできる合成法を確立した。
- (2) 合成したスピントラップ剤の有用性を、水・脂溶性、スピニアダクトの性質を調べ、特にDB-CYPはCYPMPOと同じ信号を与える事、脂溶性成分の影響が高く得られる事などからその有用性の高いことを示した。
- (3) マヨネーズのようなエマルジョンの試料でも、水試料でも同様に計測出来る新しいスピントラップ実験の条件を確立した。

今後は、継続申請させていただいたように、食品の評価に利用するためにはより多くのスケールでの合成が必要になることからその検討を実施している。また、脂溶性を向上させたスピントラップ剤が有効であることを示すことで、スピントラップ剤の性質によりラジカルの捕捉能も影響を受けることがわかった。そこで水溶性をより向上させたもの、金属イオンなどとの親和性を向上させたスピントラップ剤試薬の開発が必要と考えられ、現在その試薬の合成も検討している。

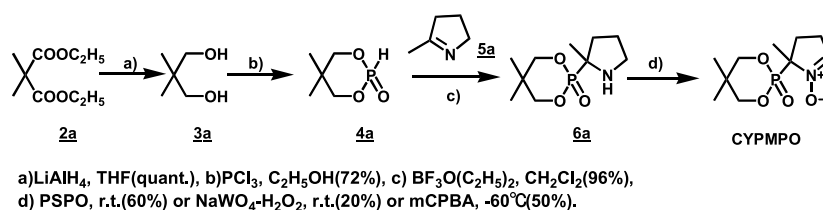
さらに、今回の検討結果を元に、多くの食品、特に油を多く含む食品の抗酸化機能、初期酸化等の評価を行っていく。

■ 文 献

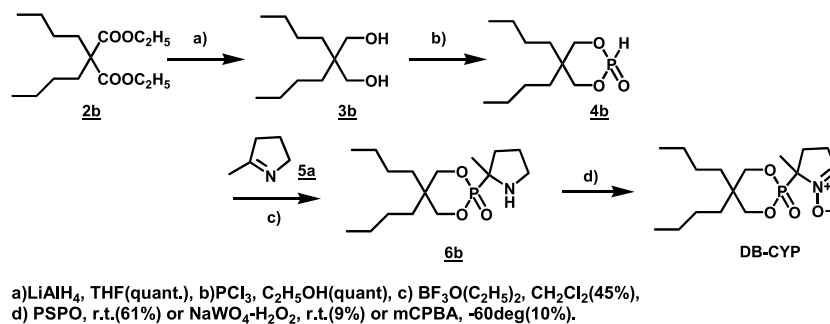
1)CYPMPO 合成オリジナル

Free Radical Research, 2006, Vol. 40, No. 11 : Pages 1166-1172

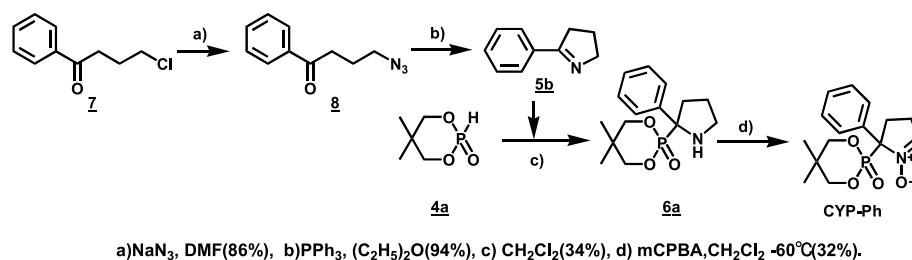
Synthesis and characterization of a practically better DEPMPPO-type spin trap, 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO)、Masato Kamibayashi, Shigeru Oowada, Hiroaki Kameda, Taiichi Okada, Osamu Inanami, Shunsaku Ohta, Toshihiko Ozawa, Keisuke Makino, and Yashige Kotake



Scheme 1 Synthesis of CYPMPO



Scheme 2 Synthesis of DB-CYP



Scheme 3 Synthesis of CYP-Ph

Table 1 Comparison of distribution coefficient(n-octanol/water)

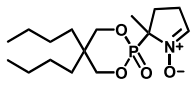
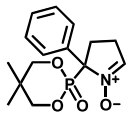
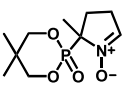
			
O/W	24.2	4.5	0.1

Table 2 各ラジカル種のスピニアダクトの半減期

	DB-CYP	CYP-Ph	CYPMPO
$\text{RO}\cdot$	17min	29min	82min
$\cdot\text{CH}_3$	8min	10min	8min
$\cdot\text{OH}$	14min	-	24min

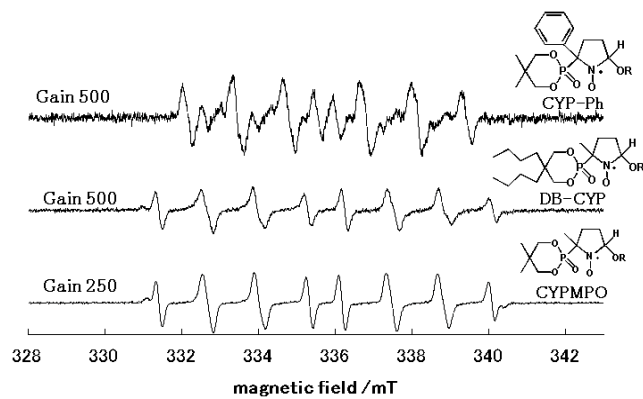


Fig. 1 ESR spectrum of spin adduct of alkoxyradical ($\cdot\text{OR}$) generated from AAPH by UV irradiation

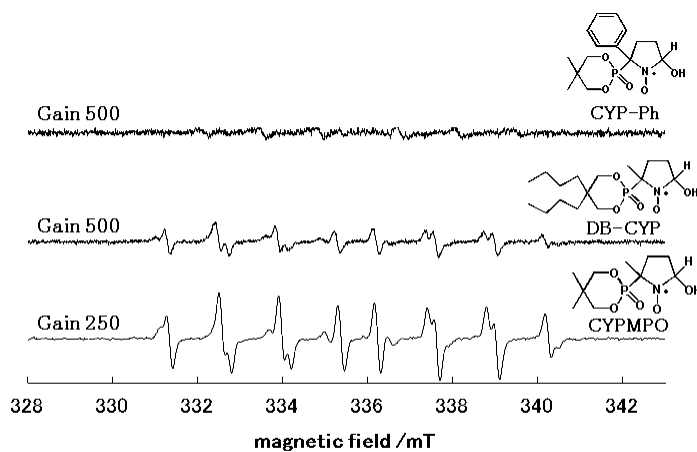


Fig. 2 ESR spectrum of spin adduct of hydroxyradical ($\cdot\text{OH}$) generated from H_2O_2 by UV irradiation

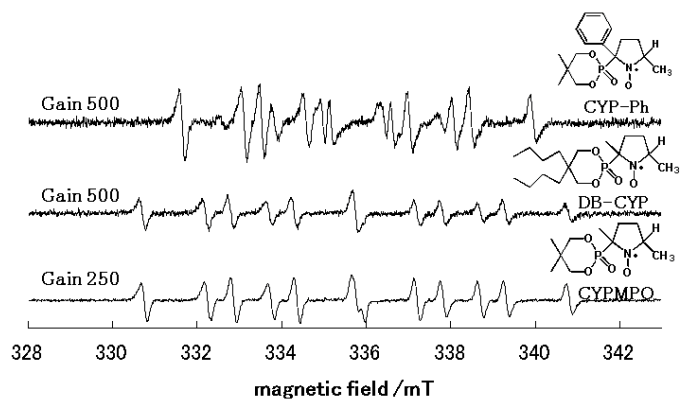


Fig. 3 ESR spectrum of spin adduct of methylradical ($\cdot\text{CH}_3$) generated from H_2O_2 and DMSO by UV irradiation

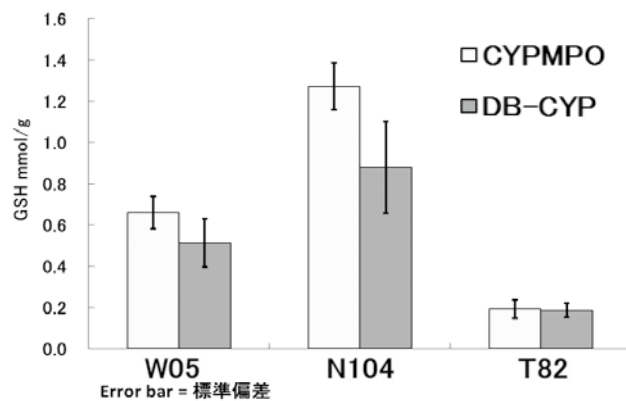


Fig.4 漢方エキス剤 1g のアルコキシラジカル抗酸化機能 GHS 相当量

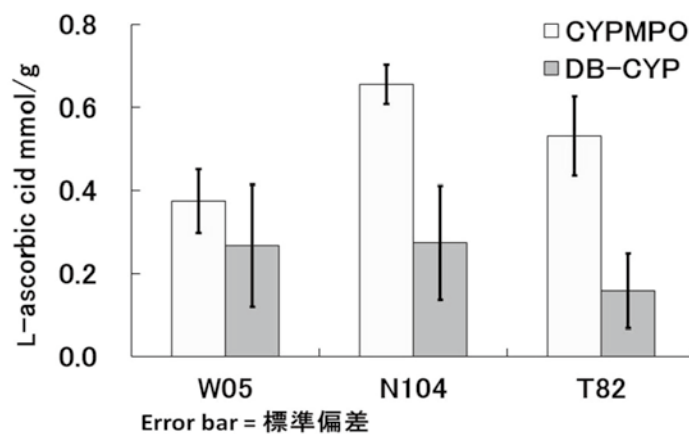


Fig.5 漢方エキス剤 1g のアルコキシラジカル抗酸化機能 L- アスコルビン酸相当量

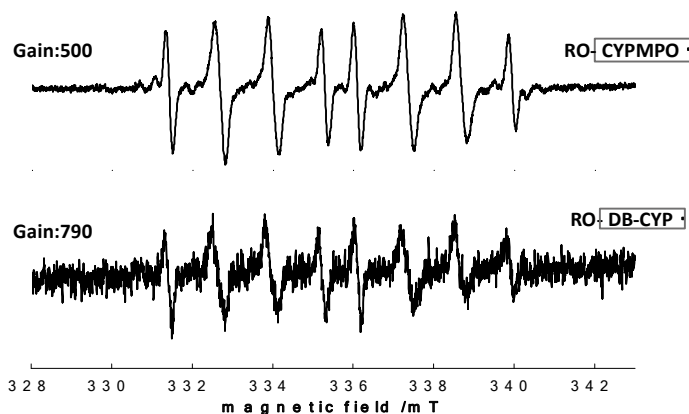


Fig.6 ESR spectrum of peroxy radical adducts using acetonitril and water system

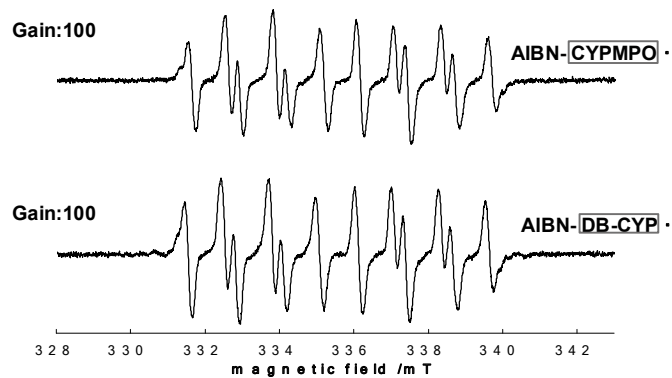


Fig. 7 ESR spectrum of alkoxy radical adducts using acetonitril and water system

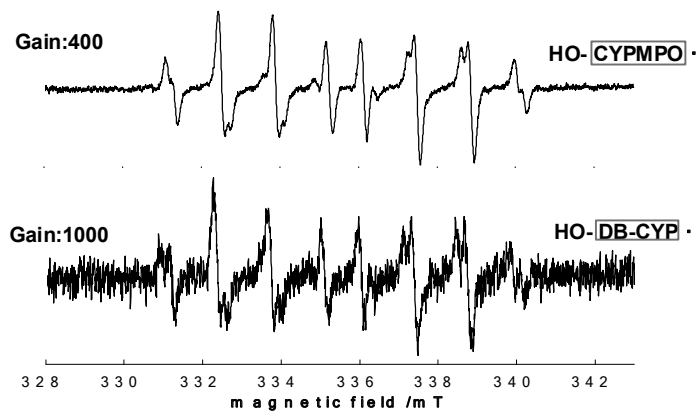


Fig. 8 ESR spectrum of hydroxy radical adducts using acetonitril and water system

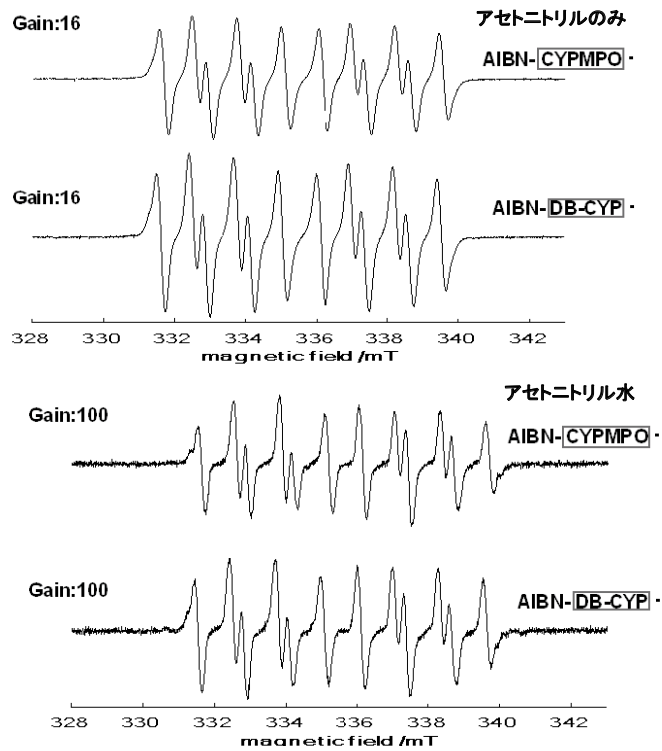


Fig.9 アセトニトリルを用いた系での AIBN 由来のアルコキシラジカルアダクトの信号

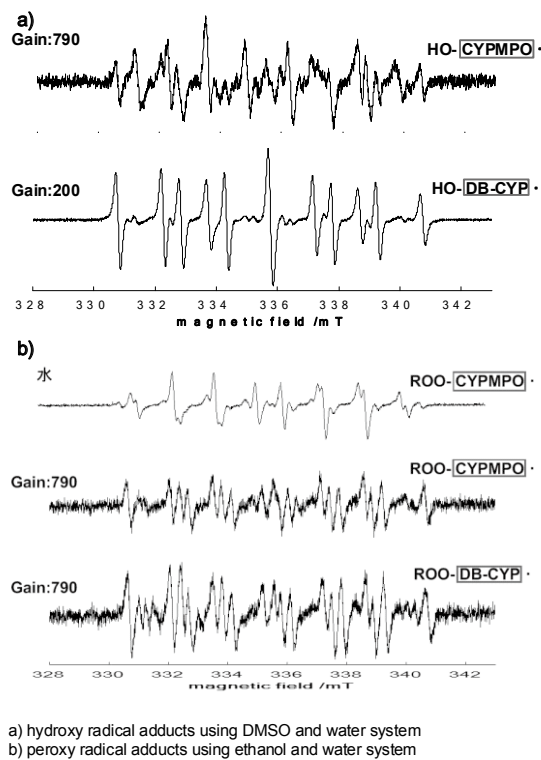


Fig.10 有機溶媒でスピニアダクトの ESR 信号が大きく変わる例

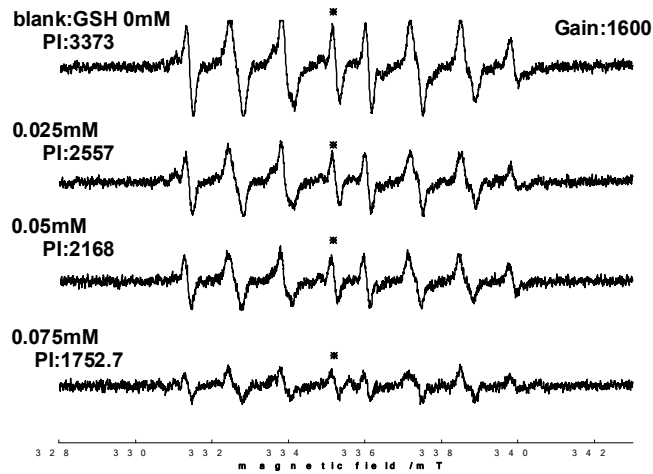


Fig. 11 ESR spectrum of CYPMPO - alkoxy radical adduct for various concentration of GSH

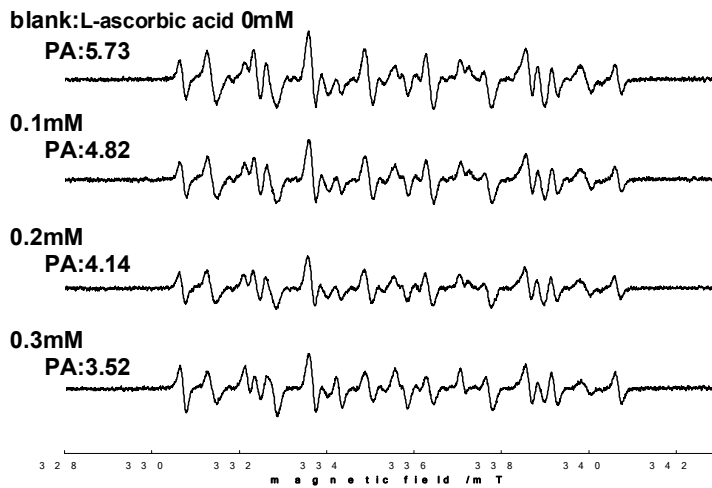


Fig. 12 ESR spectrum of CYPMPO - hydroxy radical adduct for various concentration of ascorbic acid.

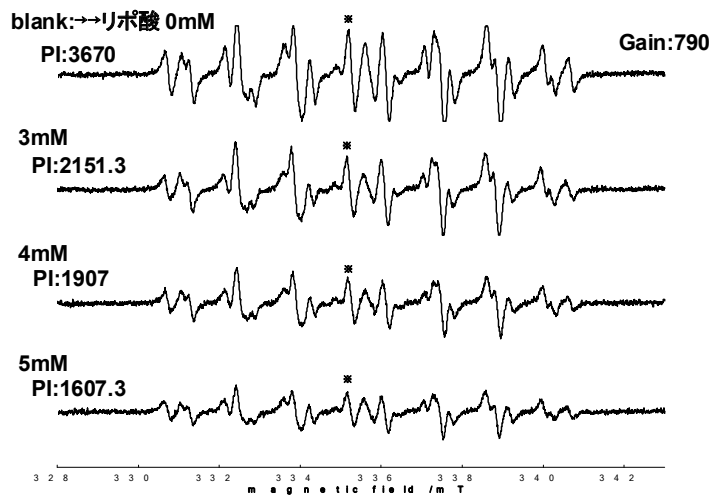
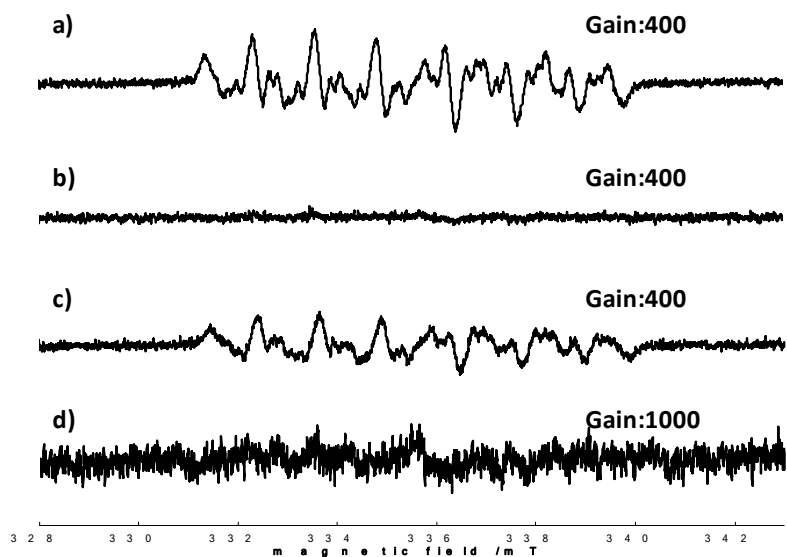


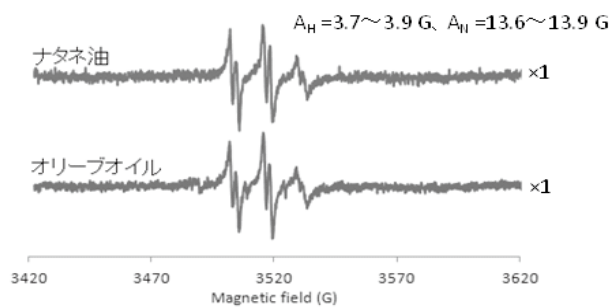
Fig. 13 ESR spectrum of CYPMPO - peroxy radical adduct for various concentration of alpha-lipoic acid.



- a) 170度加熱 (5hr) 試料にCYPMPOを加えUV照射しESR計測
- b) 170度加熱 (5hr) 試料にCYPMPOを加えUV照射しないでESR計測
- c) 非加熱試料にCYPMPOを加えUV照射しESR計測
- d) 非加熱試料にCYPMPOを加えUV照射しないでESR計測

Fig. 14 ESR spectrum of CYPMPO spin adduct from tristearoylglycerol

- a) 加熱後の油脂にPBNを加えUV照射で得られたESR信号



- b) 加熱時間と信号強度

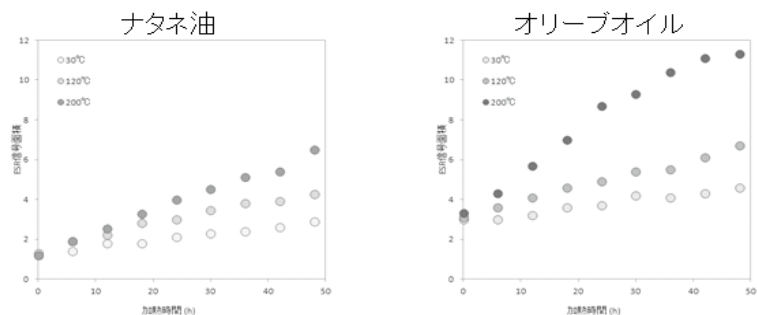


Fig. 15 油脂の加熱実験：加熱によって生じるラジカル等の検出