ESR スピントラップ法による トマトジュースの活性酸素消去能評価

亀谷宏美*・庄司俊彦**・小田切雄司***・小幡明雄***・
Trivittayasil Vipavee*・蔦 瑞樹*

(*国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門,

**国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門,

***キッコーマン株式会社研究開発本部)

(平成28年10月21日受付, 平成29年2月10日受理)

Evaluation of the reactive oxygen species scavenging abilities of tomato juice using ESR spin trapping method

Hiromi Kameya*, Toshihiko Shoji**, Yuji Otagiri***, Akio Obata***,
Vipavee Trivittayasil*, Mizuki Tsuta*

*Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-12, Kan-nondai, Tsukuba-shi, Ibaraki, 305-8642

**Institute of Fruit Tree Science, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1, Fujimoto, Tsukuba-shi, Ibaraki, 305-8605

***Research and Development Division, Kikkoman Corporation,
399, Noda, Noda-shi, Chiba, 278-0037

*〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

**〒305-8605 茨城県つくば市藤本2-1

***〒278-0037 千葉県野田市野田399

Using the electron spin resonance spin trap method, we evaluated the ability of carotenoids (lycopene, β -carotene) in tomato juice to scavenge hydroxyl radicals, alkoxy radicals, superoxide radicals, and singlet oxygen. The lycopene content in tomato juice highly contributed to its hydroxyl radical- and singlet oxygen-scavenging ability. This tendency was found to be particularly notable in dark-red tomato juice with high lycopene content. The contribution of β -carotene, whose content is high in yellow tomato juice, to the radical-scavenging ability was higher than that found in juice from tomatoes of other colors. The reactive oxygen species-scavenging ability of tomato juice was variable, suggesting that the scavenging ability depended on the types of carotenoids contained in the tomato.

1. 緒 言

トマト (*Lycopersicon esculentum*) は、生鮮食料としてのみでなく加工用としても用いられ、世界的に消費量が多い野菜のひとつである。また、トマトの色素成分として豊富に含まれるリコペンや β -カロテンなどのカロ

テノイド類には優れた活性酸素消去能があり、トマトやその加工品の摂取による疾病予防および健康維持効果が疫学的研究からも期待されている¹⁻³⁾。

食品が有する活性酸素消去能の評価に、電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance; ESR) を用いた ESR スピントラップ法があり⁴⁻⁷⁾、多種の活性酸素に対して、そ

れぞれを消去する能力の評価ができる。食品はさまざまな成分から構成されるため、その活性酸素消去機構も複雑で、活性酸素の種類によって異なる消去能を示すことが予想される。トマトも、一般的に知られている抗酸化成分であるカロテノイド以外の成分を多種含んでおり、その活性酸素消去能を評価した報告がある¹⁻³⁾。しかし、多種の活性酸素消去能を同時に評価した報告はない。

そこで、本研究では色調の異なるトマトジュースが有する、4種の活性酸素（ヒドロキシラジカル、アルコキシラジカル、スーパーオキシドラジカル、一重項酸素）に対する消去能をESRスピントラップ法により評価した。さらに、トマトジュースの含有成分として広く知られているカロテノイド（リコペン、 β -カロテン）についても同様に活性酸素消去能を評価し、トマトジュースが有する消去能への寄与率を評価した。

2. 実験方法

(1) 試料

トマトジュースの原料となるトマトは、群馬県産のものを使用した。赤色（試料番号1～5）、黄色（試料番号6～8）、濃赤色（試料番号9～11）の色調の異なる11種類のトマトを収穫後直ちに一般的な加工法、すなわち、トマトを水洗、トリミング後に加熱、圧搾することによりジュース（無塩・シーズンパック製法）にした⁸⁾。

測定に使用した試薬は、カロテノイド標準品も含め、すべて和光純薬工業株式会社のものを使用した。

トマトジュースに含まれるリコペンは有機溶媒抽出（比色）法⁹⁾で、 β -カロテンはHPLC法¹⁰⁾で測定した。また、色調は測色色差計（Color Meter ZE2000 日本電色工業株式会社）で測定し、ハンター Lab 表式系で表した。

(2) ESR 測定条件

ESR分光器はXバンド（9.8 GHz）のEMX-plus（ブルカーバイオスピン株式会社）を用いた。測定条件を、中心磁場3521 G、測定磁場範囲200 G、磁場変調幅1 Gおよびマイクロ波強度6 mWと設定し、室温にて測定した。活性酸素は、活性酸素生成試薬に紫外線（UV）もしくは可視光を照射して生成させた。スポット光源（LC8、浜松ホトニクス）に200 Wの水銀キセノンランプをセットし、光強度4500 mW/cm²、UVを200～400 nm、可視光を400～650 nmの波長範囲で発生するように設定した。スポット光源に接続された石英ファイバーをESRのサンプルホルダーの前に取り付けた。光照射時間はコンピュータ制御し、自動シャッター機能による照射時間の誤差は0.01秒であった。活性酸素生成試薬を含む測定溶液をシリンジ付ディスポ偏平セル（ラジカルリサーチ株式会社）で吸い上げ、セルをESRキャビティー内にセットした後照射処理を行い、照射後すみやかにESRでアダクト信号を計測した。

(3) ESR スピントラップ法

本研究の活性酸素消去能評価は、ESRスピントラップによるMULTIS法⁶⁻⁷⁾に従い、以下の通りに測定した。

ヒドロキシラジカル消去能は、試料または標準試薬50 μ Lに、活性酸素生成試薬として0.25%のH₂O₂を50 μ L、スピントラップ剤として5 mMの5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO)を20 μ L、0.75 mMのDiethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)を30 μ LおよびpH 7.4の100 mMリン酸バッファー (PB)を80 μ L加え、得られた混合溶液に5秒間UV照射して測定した。検量線のための標準試薬はMannitolを使用した。

アルコキシラジカル消去能は、試料または標準試薬50 μ Lに、活性酸素生成試薬として1 mMの2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)を50 μ L、5 mMのCYPMPOを20 μ LおよびpH 7.4の100 mMのPBを80 μ L加え、得られた混合溶液に5秒間UV照射して測定した。標準試薬はTroloxを使用した。

スーパーオキシドラジカル消去能は、試料または標準試薬50 μ Lに、活性酸素生成試薬として40 μ Mのリボフラビン40 μ L、1 mMのEthylenediaminetetraacetic acid (EDTA)を20 μ L、20 mMのCYPMPOを40 μ L、10 μ MのGlycineを20 μ LおよびpH 7.4の100 mMのPBを30 μ L加え、得られた混合溶液に30秒間可視光照射して測定した。標準試薬は α -lipoic acidを使用した。

一重項酸素消去能は、試料または標準試薬30 μ Lに、活性酸素生成試薬として0.1 mMのPterineを30 μ L、スピントラップ剤として10 mMの2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidone hydrochloride (TMPD)を30 μ L、1 mMのDTPAを20 μ L、水を130 μ LおよびpH 7.4の100 mMのPBを60 μ L加え、得られた混合溶液に30秒間可視光照射して測定した。標準試薬はglutathione (GSH)を使用した。

測定したデータは、Kohriらのスピントラップ法における解析法¹¹⁾を用いて解析した。本研究では、ヒドロキシラジカル消去能はMannitol相当量、アルコキシラジカル消去能はTrolox相当量、スーパーオキシドラジカル消去能は α -lipoic acid相当量、一重項酸素消去能はGSH相当量としてそれぞれ評価した。また、得られた評価結果は統計解析ソフトウェアのJMP11 (SAS Institute Inc.)を使用して解析した。

3. 実験結果と考察

(1) トマトジュースの含有成分と色調

表1にトマトジュースが含有するリコペン、 β -カロテンと色調 (L, a, b) の測定結果を示した。リコペンが多い、赤色（試料番号1～4）や濃赤色（試料番号9～11）のトマトジュースはa値が高く、 β -カロテンの多い試料番号6～7のトマトジュースはb値が高いという結果が得られた。しかし、試料番号8のトマトジュース

表1 トマトジュースの成分含量と色調

試料 番号	ジュースの色	リコペン (mg/100 g)	β -カロテン (mg/100 g)	Lab 表色		
				L	a	b
1	赤色	10.88	147	24.2	25.3	12.1
2	赤色	9.44	131	25.2	24.7	12.7
3	赤色	6.77	200	26.0	22.1	13.8
4	赤色	7.51	250	25.6	22.4	13.6
5	赤色	7.19	207	26.0	22.5	13.8
6	黄色	1.17	2290	34.0	13.0	20.5
7	黄色	2.61	1770	30.2	16.6	17.8
8	黄色	0	306	36.2	14.8	23.7
9	濃赤色	15.7	318	24.9	28.3	13.7
10	濃赤色	13.54	297	25.5	27.6	13.8
11	濃赤色	12.52	314	26.0	27.4	14.2

表2 トマトジュースの活性酸素消去能

試料 番号	ジュースの色	$\cdot$ OH 消去能 (mmol mannitol eq./mL)	$\cdot$ OR 消去能 (mmol trolox eq./mL)	$O_2^{\cdot-}$ 消去能 (mmol α -lipoic acid eq./mL)	1O_2 消去能 (mmol GSH eq./mL)
1	赤色	1271	22.7	76	26.1
2	赤色	1143	28.8	101	9.9
3	赤色	1119	12.0	65	13.0
4	赤色	1359	37.3	112	25.3
5	赤色	1809	25.9	89	23.5
6	黄色	1907	33.5	108	24.6
7	黄色	1832	34.9	102	14.8
8	黄色	1880	34.1	100	15.5
9	濃赤色	738	41.1	131	18.3
10	濃赤色	800	38.7	127	15.6
11	濃赤色	1069	33.9	99	13.1
リコペン		111	0.5	2.1	1.7
β -カロテン		436	7.1	2.7	5.8

スは β -カロテン含有量は少ないにもかかわらず、最も高いb値を示した。このような β -カロテンが少ない黄色系トマトには ζ -カロテンなどのカロテノイドを含有するトマトの報告がある¹²⁾。試料番号8のトマトジュースの原料となったトマトも同様に β -カロテン以外のカロテノイドを含有していると考えた。これらの情報から、トマトジュースの色調はカロテノイド含有量に強く依存していることが示された。

(2) ESR スペクトル

図1(左図)に、各活性酸素とCYPMPPOおよびTMPDのアダクトのESRスペクトルを示した。横軸は磁場を、縦軸はマイクロ波の吸収の大きさを表している。各活性酸素消去能を求めるには基準となる信号強度が必要となる。そこで既報⁴⁻⁷⁾に従い、信号線幅の変動が少ない「*」を印した信号の強度を基準として用いた。図1(右図)に活性酸素消去能を標準試薬濃度相当量として評価するための検量線を示した。

(3) 活性酸素消去能

表2にトマトジュースおよび標準品のカロテノイド(リコペン、 β -カロテン)の各活性酸素消去能の評価結果を示した。活性酸素消去能の値はすべて正であり、本実験で測定した試料は全て、ヒドロキシラジカル($\cdot$ OH)、アルコキシラジカル($\cdot$ OR)、スーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)および一重項酸素(1O_2)を消去する能力があることが示された。なお、本測定系は水系であるため、親油成分であるリコペン、 β -カロテンはそれぞれ1.055 μ g/mLになるようアセトンに溶解して測定に供した。

表3に本測定系における、カロテノイド(リコペン、 β -カロテン)によるトマトジュースの各活性酸素消去能への寄与率を示した。これは、表1に示すカロテノイドの含有量と表2に示す各活性酸素消去能から、次のように算出した。

$$\text{寄与率 (\%)} = \frac{\text{トマトジュース含有量のカロテノイドの活性酸素消去能}}{\text{トマトジュースの活性酸素消去能}} \times 100$$

ヒドロキシラジカル

アルコキシラジカル

スーパーオキシドラジカル

一重項酸素

図1 各アダクトの ESR スペクトル (左) と検量線 (右)

表3 カロテノイドの寄与率 (%)

試料 番号	ジュースの色	・OH消去能への寄与率(%)		・OR消去能への寄与率(%)		O ₂ ⁻ 消去能への寄与率(%)		¹ O ₂ 消去能への寄与率(%)	
		リコペン	β-カロテン	リコペン	β-カロテン	リコペン	β-カロテン	リコペン	β-カロテン
1	赤色	89.3	4.8	21.8	4.4	28.5	0.5	67.2	3.1
2	赤色	86.1	4.7	14.9	3.1	18.6	0.3	153.7	7.3
3	赤色	63.1	7.4	25.7	11.2	20.7	0.8	83.9	8.5
4	赤色	57.6	7.6	9.2	4.5	13.3	0.6	47.8	5.4
5	赤色	41.4	4.7	12.6	5.4	16.1	0.6	49.3	4.8
6	黄色	6.4	49.6	1.6	46.0	2.2	5.4	7.7	51.2
7	黄色	14.9	39.9	3.4	34.1	5.1	4.4	28.4	65.7
8	黄色	0.0	6.7	0.0	6.0	0.0	0.8	0.0	10.9
9	濃赤色	221.8	17.8	17.4	5.2	23.9	0.6	138.2	9.6
10	濃赤色	176.5	15.3	15.9	5.2	21.2	0.6	139.9	10.5
11	濃赤色	122.1	12.1	16.8	6.2	25.2	0.8	154.0	13.2

リコペンは、試料番号1～5の赤色と9～11のトマトジュースの各活性酸素消去能で、β-カロテンの約3～60倍の高い寄与率を示した。特に、ヒドロキシラジカルと一重項酸素消去能では、リコペン含有量が高い濃赤色のトマトジュースで100%を超える寄与率が算出された。寄与率が100%を超えるということは、トマトジュース含有のカロテノイド量から算出された活性酸素消去能が、トマトジュース自体の活性酸素消去能より大きいことを示している。トマトジュースはカロテノイド以外にも糖やビタミン、アミノ酸などさまざまな成分を含有している¹³⁾。それら含有成分は、トマトジュースが受けた光や温度によって活性酸素を生じさせる、カロテノイドを酸化させて活性酸素消去能を減少させる¹⁴⁻¹⁵⁾など、複雑な化学反応を起こしている。そのため、トマトジュースの実際の消去能は、標準試薬のリコペンをを用いて産出した活性酸素消去能より低くなったと推測した。β-カロテンは、含有量が多い試料番号6～7の黄色のトマトジュースで、他の色のトマトジュースより、活性酸素消去能に高い寄与率を示した。その寄与率は、ヒドロキシラジカル、アルコキシラジカル、一重項酸素消去能で大きな違いはなかったが、スーパーオキシドラジカル消去能への寄与率は他の3種の活性酸素消去能と比較して非常に低かった。

4. 結 論

ESR スピントラップ法により、複数の活性酸素（ヒドロキシラジカル、アルコキシラジカル、スーパーオキシドラジカルおよび一重項酸素）に対するトマトジュースの消去能を評価した。さらに、トマトジュースの主要な含有成分であるカロテノイド（リコペン、β-カロテン）についても同様に消去能評価した。

トマトジュースの活性酸素消去能において、リコペンは高い寄与率を示した。特に、ヒドロキシラジカルと一重項酸素の消去能が高く、リコペン含有量が高い濃赤色のトマトジュースでは、その傾向が顕著であった。β-

カロテンは、リコペンと比較するとトマトジュースの活性酸素消去能への寄与率は低いが、含有量が多い黄色のトマトジュースでは、他の色のトマトジュースより、活性酸素消去能に高い寄与率を示した。

トマトジュースが含有するカロテノイドの種類によって活性酸素消去能に異なる傾向が示された。

謝 辞

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「農林水産資源を活用した新需要創出プロジェクト」の課題、「国産農産物の潜在的品質の評価技術の開発」の成果である。

文 献

- 1) 平山雄：ビタミン研究の新しい波，中外医薬，45，329-338（1992）
- 2) Etmninan, M., Takkouche, B. and Caamano-Isorna, F.: The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 13, 340-345 (2004)
- 3) Bone, R.A. and Landrum, L.T.: Macular carotenoids in eye health. In: Packer, L., Obermuller-Jevic, U. C., Kramer, K., Sies, H., eds. Carotenoids and Retinoids: Molecular Aspects and Health Issues. Champaign, IL: AOCS Press; 115-129 (2004)
- 4) Kameya, H., Watanabe, J., Takano-Ishikawa, Y. and Todoriki, S.: Comparison of scavenging capacities of vegetables by ORAC and EPR. *Food Chem.*, 145, 866-873 (2014)
- 5) Kameya, H. and Ukai, M.: New ESR detection method of hydroxyl radical scavenging activity of blue berry. *J. Materials Sci. Engineer.*, B1, 347-351 (2011)
- 6) Endo, N., Oowada, S., Sueishi, Y., Shimmei, M., Makino, K., Fujii, H., and Kotake, Y.: Serum hydroxyl radical scavenging capacity as quantified with iron-free hydroxyl radical source. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 45, 193-201 (2009)
- 7) Oowada, S., Endo, N., Kameya, H., Shimmei, M., and Kotake, Y.: Multiple free radical scavenging capacities in serum. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 51, 117-121 (2012)
- 8) 全国清涼飲料工業会，日本炭酸飲料検査協会：最新・ソ

- フトドリンクス, 光琳, 東京, pp.418 (2003)
- 9) 日本食品科学工学会, 食品分析研究会: 新・食品分析法 (I), 光琳, 東京, pp.643-650 (2006)
- 10) 安本教傳, 竹内昌昭, 安井明美, 渡邊智子: 五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル, 建帛社, 東京, pp.83-88 (2006)
- 11) Kohri, S., Fujii, H., Oowada, S., Endoh, N., Sueishi, Y., Kusakabe, M., Shimmei, M. and Kotake, Y.: An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Analytical Biochem.*, **386**, 167-171 (2009)
- 12) 広田才之, 佐藤寿, 露木英男: トマト純系 strains の果肉中のカロチノイド分析, 日食工誌, **29** (8), 477-483 (1982)
- 13) 日本食品成分表2015年版(七訂)本表編, 医歯薬出版, 東京, pp.112 (2016)
- 14) 三木登, 赤津一衛: トマト中の抗酸化物質(第1報) トマト抽出物のカロチン漂白能と抗酸化能, 日食工誌, **19** (8), 365-370 (1972)
- 15) 稲熊隆博: 野菜の色に宿るチカラを探る—加工・調理の重要性, 日調科誌, **47** (4), 195-201 (2014)