

ブルーベリー果実抽出液の DPPH ラジカル 消去活性評価に及ぼす測定方法の影響 —HPLC 法と UV-VIS 法の比較—

芝田 裕磨 ・ 大原 厚祐 ・ 武井 千弥 ・ 松本かおり
長谷川哲也 ・ 秋元 雅之 ・ 光本 篤史

【要旨】

ブルーベリー中に豊富に含まれるアントシアニン類（抗酸化物質）は、体内のフリーラジカルを低減させる効果があると言われている。これらアントシアニン類の抗酸化能は、安定なフリーラジカルである 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) を用いて評価されるのが一般的である。また、DPPH ラジカル消去活性の測定法としては、紫外可視分光光度計を用いた比色定量（UV-VIS 法）と HPLC 法の 2 法が報告されている。本研究の目的は、ブルーベリーのような着色食品の抗酸化能測定について、これら 2 つの方法の妥当性を比較検討することにある。

ラジカル消去活性は 517 nm における DPPH の吸収減少を測定することで評価される。我々はブルーベリーのフリーラジカル消去活性を測定した。両測定方法により 2 品種のブルーベリーについて、フリーラジカル消去活性の測定を行った。その結果、HPLC 法と UV-VIS 法により測定したラジカル消去活性の間に高い相関が認められた。しかしながら、UV-VIS 法により測定したラジカル消去活性は、HPLC 法により測定した値より常に 1.5 倍高値を示した。HPLC 法は着色食品中のフリーラジカル消去活性測定において有用であると考えられた。一方で、HPLC 法と UV-VIS 法との回帰直線の傾きは、今回測定した 2 つのブルーベリー種でほぼ類似した値であった。この結果は、UV-VIS 法は適切な補正を行えば、着色試料にも適用できることを示している。UV-VIS 法は簡便かつ迅速であるため、アントシアニン類のように化学的に不安定な着色試料間のフリーラジカル消去活性の相対比較に有用であると判断した。

キーワード：ブルーベリー、DPPH ラジカル消去活性、HPLC 法、UV-VIS 法、
アントシアニン

1. 緒 言

ブルーベリー (*Vaccinium*, family *Ericaceae*) の果実には、ポリフェノール成分の一つであるアントシアニン類が豊富に含まれている¹⁾。アントシアニン類は高い抗酸化能を有することが知られており、酸化ストレス関連疾患、すなわち、動脈硬化、糖尿病、がんなどの生活習慣病の発症予防を担う物質として注目されている²⁾。そのため、一次予防の観点からブルーベリー果実の抗酸化能について詳細に検討することは極めて重要であり、これまでにブルーベリー果実の抗酸化能に対する品種や発育条件（産地、日照時間、収穫時期など）の影響について研究が行われている^{3,4)}。

ブルーベリー果実の抗酸化能測定には、代表的な食品中の抗酸化能評価法である 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性法を用いることが多い。安定なラジカルである DPPH は、抗酸化物質存在下では、非ラジカル体に変化する。DPPH ラジカル消去活性法は、この性質を利用して DPPH と抗酸化物質を混合した溶液の波長 517 nm における吸光度を測定することで抗酸化能を評価する。DPPH ラジカルは、生体内に存在しないモデルラジカルであるため、生体関連性がどの程度あるか不明であるものの、簡便な比色定量を用いて抗酸化能を評価できるため汎用されている。

多くのアントシアニン類の研究では、DPPH ラジカル消去活性法による抗酸化能を分離過程のない UV-VIS (Ultraviolet visible spectrophotometry) 法で測定し、アントシアニン類の吸光度を差し引くことで算出している。一方で、ブルーベリー果実中の抗酸化能を DPPH ラジカル消去活性法により測定する場合、アントシアニン類と DPPH の吸収波長が重なるため、HPLC 法を用いてアントシアニン類と DPPH を分離して測定することが推奨されている⁵⁾。アントシアニン類の抗酸化能を DPPH ラジカル消去活性法で評価する場合は、UV-VIS 法で測定した抗酸化能の値が妥当なものかどうか HPLC 法で測定した抗酸化能の値と比較することが重要であるが、これら測定方法の影響についての報告はほとんどない。

そこで本研究では、市販（メキシコ産）および千葉県立農業大学校（東金）で栽培されたブルーベリー果実抽出液の DPPH ラジカル消去活性法による抗酸化能評価について、HPLC 法および UV-VIS 法を用いて測定し、これら測定方法の妥当性を比較・検討した。

2. 方 法

2-1 試薬および実験材料

千葉県内で購入した市販メキシコ産ブルーベリー（品種：不明）および千葉県立農業大学校から供与された国内（東金）産ブルーベリー（品種：ナイトジェム）を実験に使用した。ブルーベリー果実は使用前まで -30°C にて冷凍保存した。

Trifluoroacetic acid (TFA) は関東化学株式会社（東京、日本）から、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl

chromane-2-carboxylic acid (Trolox)、DPPH は Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis、MO、USA) から、2-amino-2-hydroxy methyl-1,3-propanediol (Tris) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。その他の溶媒は市販特級もしくは高速液体クロマトグラフ用を購入して用いた。

2-2 アントシアニン類の抽出方法

凍結したブルーベリー果実を無作為に 3 粒選び、重量を測定した。これらを乳鉢と乳棒ですりつぶし、1% TFA 溶液 40 mL を加え、遠沈管に移し、超音波発生装置 (31 kHz、20 分間) で処理した。その後、遠心分離 (4°C、1,980×g、15 分間) を行い、上清を 200 mL 容メスフラスコに移した。沈殿した果実に再度 1% TFA 溶液 40 mL を加え、同様の操作を計 3 回行った。回収した上清に 1% TFA 溶液を加え、200 mL に定容し、ろ過した。ろ液 1 mL をマイクロチューブに移し、遠心分離 (4°C、10,000×g、5 分間) を行った後に、上清を孔径 0.45 μm の GL クロマトディスク (ジーエルサイエンス株式会社、東京) を用いてろ過し、ブルーベリー果実抽出液を得た。

2-3 DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH は安定なラジカルであり、ラジカル消去物質が存在すると非ラジカル体に変化する (Fig. 1)。この性質を利用して、DPPH とラジカル消去物質を混合した溶液の 517 nm における吸光度を測定することでラジカル消去物質の抗酸化能を算出した⁶⁾。

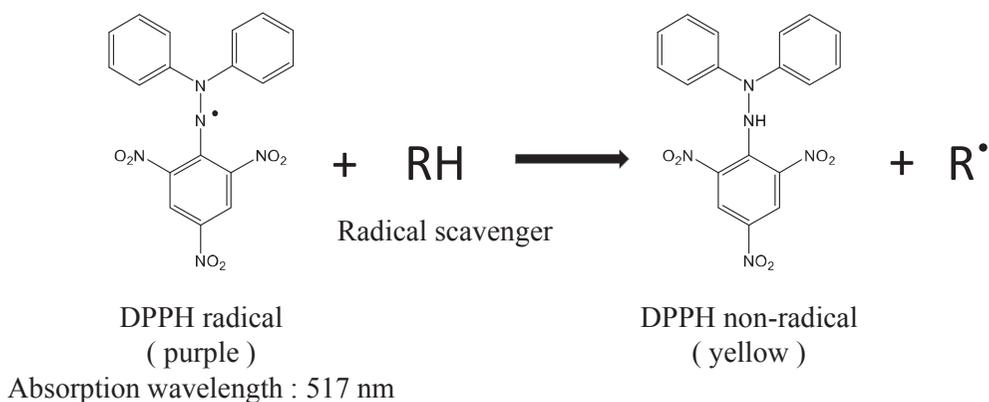


Fig.1 Schema of DPPH radical scavenging activity method.

ブルーベリー果実抽出液をマイクロチューブにそれぞれ 100、250、500、1000 μL 分注し、1% TFA 溶液を加え、全量を 1 mL とした。100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 400 μL に調製したブルーベリー果実抽出液 100 μL、エタノール 250 μL および 400 μM DPPH エタノール溶液 250 μL を順に加え、室温、暗所にて 20 分間静置した後に、孔径 0.45 μm のメンブランフィル

ターを用いてろ過し、そのろ液を測定試料とした。

標準物質には、Trolox を用いた。各濃度の Trolox エタノール溶液（20、40、80、120、160 μM ）を調製し、100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 400 μL 、1% TFA 溶液 100 μL 、調製した Trolox エタノール溶液 250 μL に 400 μM DPPH エタノール溶液 250 μL を加え、室温、暗所にて 20 分間静置した後に、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターを用いてろ過したものを標準液とした。ブランクは Trolox を含まないエタノールを用い、標準液と同様に調製した。

Trolox を用いて回帰直線を作成し、抽出液添加量 (μL / assay) に相当する Trolox 量 (nmol of TE / assay) として算出した。また、Trolox 検量線の直線性、検出限界 (Limit of detection : LOD) および定量限界 (Limit of quantification : LOQ) について確認した。

(a) HPLC による抗酸化能の測定

HPLC による分析には、システムコントローラー : SCL-10Avp、ポンプ : LC-10ATvp および LC-10ADvp、脱気装置 : DGU-14A、紫外・可視吸光度検出器 : SPD-10Avp、カラムオーブン : CTO-10Avp (株式会社島津製作所、京都、日本) を使用し、C8 シリカゲルを充填したカラム (BDS HYPERSIL C8, 250 mm \times 4.6 mm) を定量に用いた。抗酸化能測定のための HPLC 条件を Table 1 に示す。

Table 1 HPLC condition for antioxidant activity measurement.

mobile phase	methanol : water = 8 : 2
flow rate	1.0 mL/min
column temperature	35°C
injection volume	20 μL
wavelength	517 nm

(b) UV-VIS による抗酸化能の測定

UV-VIS による分析には、UV-2450 (株式会社島津製作所) を使用し、測定は 517 nm の波長領域で行った。ただし、ブルーベリー果実抽出液に含まれるアントシアニン類も 517 nm で吸収が認められるため、DPPH 溶液の代わりにエタノールを使用したブルーベリー果実抽出液 100 μL 、100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 400 μL およびエタノール 500 μL の混合液 (A 液) の吸光度を測定し、以下に示す式 1 で補正した⁷⁾。

$$\text{補正吸光度値} = \text{測定試料の吸光度} - \text{A 液の吸光度値} \quad (1)$$

2-4 ブルーベリー果実 1 g あたりの DPPH ラジカル消去活性の算出

沖らの方法⁷⁾を一部改変してブルーベリー果実 1 g あたりの DPPH ラジカル消去活性 (μmol of TE / g) を算出した。横軸に Trolox 添加量またはブルーベリー果実抽出液添加量、縦軸に 517 nm における吸光度値または補正吸光度値をプロットし、Trolox および測定試料の回帰直線を作成した。式 2 で示したように DPPH ラジカル消去活性は測定試料の回帰直線の傾き (a_2) を Trolox の回帰直線の傾き (a_1) で除して算出した。また、式 3 には、式 2 で算出された DPPH ラジカル消去活性をブルーベリー果実抽出液の濃度 (C) で除することで、ブルーベリー果実 1 g あたりの DPPH ラジカル消去活性を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{DPPH ラジカル消去活性 (nmol of TE / } \mu\text{L)} \\ & = a_2 (A517 / (\mu\text{L / assay})) \quad / \quad a_1 (A517 / (\text{nmol / assay})) \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} & \text{ブルーベリー果実 1 g あたりの DPPH ラジカル消去活性 (} \mu\text{mol of TE / g)} \\ & = \text{DPPH ラジカル消去活性 (} \mu\text{mol of TE / mL)} \quad / \quad C (\text{g / mL}) \end{aligned} \quad (3)$$

2-5 統計処理

データはすべて平均値 (mean) \pm 標準偏差 (S.D.) にて表記した。相関性の解析には Pearson の相関係数を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

3-1 直線性、LOD および LOQ

HPLC および UV-VIS を用いて作成した Trolox 検量線の直線性、LOD および LOQ を Table 2 に示す。HPLC、UV-VIS とともに 10-40 nmol/assay の Trolox 濃度範囲において高い直線性が認められた。また、LOD および LOQ には大きな差は認められなかった。

Table 2 Linearity, LOD and LOQ of calibration curve prepared using HPLC and UV-VIS. (n=7)

	Linear regression equation ($y = ax + b$)				
	Slope (a)	Intercept (b)	Correlation (r)	LOD (nmol/assay)	LOQ (nmol/assay)
HPLC assay	1.000	0.000	0.999	6.061	18.365
UV-VIS assay	1.000	0.000	0.998	5.091	15.429

3-2 測定方法間での抗酸化能の比較

メキシコ産ブルーベリー果実抽出液を用いて、抽出液添加量と抗酸化能の関係を HPLC 法および UV-VIS 法で測定した結果を Fig. 2 および 3 に示す。HPLC 法、UV-VIS 法ともにブルー

ベリー果実抽出液添加量の増加に伴い、抗酸化能が増加した (Fig. 2)。また、HPLC 法と UV-VIS 法で測定した抗酸化能の間に高い相関が認められたが ($r = 0.985$ 、 $p < 0.001$)、UV-VIS 法で測定された抗酸化能は HPLC 法で測定された抗酸化能より約 1.5 倍高値を示した (Fig. 3)。

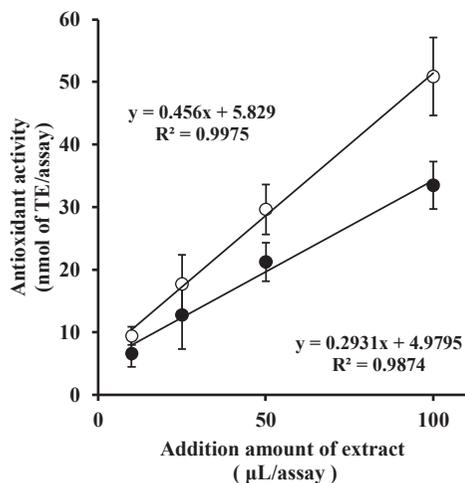


Fig.2 Antioxidant activity of commercial blueberry fruit (Mexico) extracts determined by UV-VIS and HPLC.

○ : UV-VIS, ● : HPLC.

Data represent the means \pm S.D. (n=5)

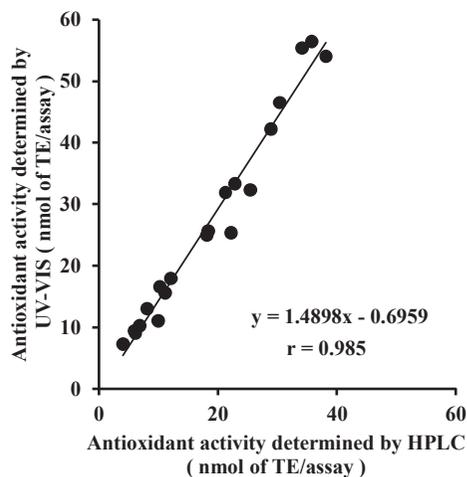


Fig.3 Correlation between the antioxidant activity of commercial blueberry fruit (Mexico) determined by UV-VIS and by HPLC. (n=20)

東金産ブルーベリーの抗酸化能をメキシコ産と同様の方法で測定した結果を Fig. 4 および 5 に示す。HPLC 法、UV-VIS 法ともにブルーベリー果実抽出液添加量の増加に伴い、抗酸化能が増加した (Fig. 4)。また、HPLC 法と UV-VIS 法で測定した抗酸化能の間にも高い相関が認められたが ($r = 0.992$ 、 $p < 0.001$)、メキシコ産と同様に UV-VIS 法で測定された抗酸化能は HPLC 法で測定される抗酸化能の約 1.6 倍高値を示した (Fig. 5)。

Table 3 および 4 に示したブルーベリー果実 1 g あたりの DPPH ラジカル消去活性 ($\mu\text{mol of TE/g}$) も同様の結果となった。

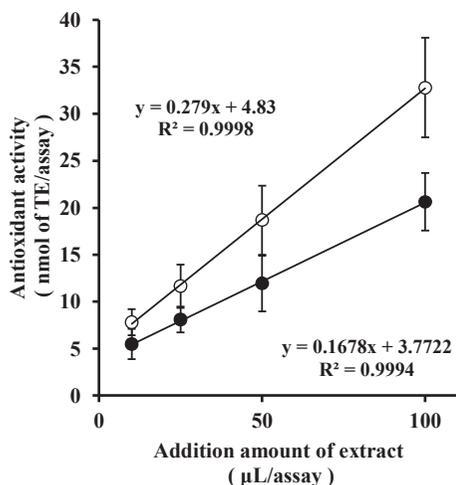


Fig.4 Antioxidant activity of harvested blueberry fruit (Togane) extracts determined by UV-VIS and HPLC.

○ : UV-VIS, ● : HPLC.

Data represent the means ±S.D. (n=3)

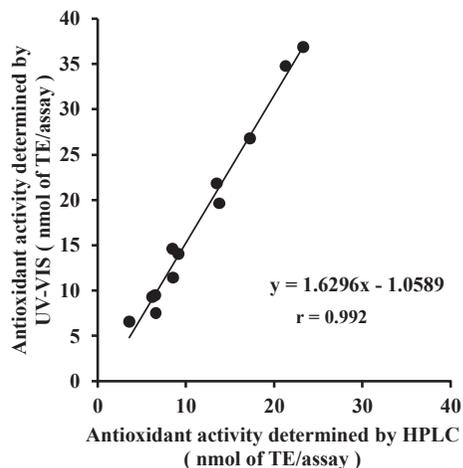


Fig.5 Correlation between the antioxidant activity of harvested blueberry fruit (Togane) determined by UV-VIS and by HPLC.(n=12)

Table 3 Antioxidant activity per gram of commercial blueberry fruit (Mexico).

	$\mu\text{mol of TE/g}^*$	SD
UV-VIS	31.396	5.016
HPLC	20.194	2.640

*Calculated by dividing the slope of regression line made with the blueberry fruit extract by the slope of regression line created by Trolox. (n=5)

Table 4 Antioxidant activity per gram of harvested blueberry fruit (Togane).

	$\mu\text{mol of TE/g}^*$	SD
UV-VIS	23.399	3.899
HPLC	14.073	1.808

* Calculated by dividing the slope of regression line made with the fruit extract of blueberry harvested at Chiba Prefectural Agricultural College by the slope of regression line created by Trolox. (n=3)

4. 考 察

DPPH ラジカル消去活性評価法は DPPH ラジカル溶液と測定試料を混合し、一定時間反応させた後に 517 nm の吸光度を測定して、試料のラジカル消去活性を評価する。吸光度を測定するだけで抗酸化能が評価できる非常に簡便な方法であるため、これまで最も広く用いられてきた。一方で、アントシアニン類を含有する着色試料など、測定波長と試料の吸収波長が重なる場合は、測定が困難であるという欠点が指摘されている。本研究においては、HPLC 法と UV-VIS 法によって DPPH ラジカル消去活性法による抗酸化能評価を行い、同一試料による測定方法の妥当性を評価した。

本研究で、HPLC と UV-VIS の LOD および LOQ に有意な差が認められなかったことから

両測定法の精度には著しい差がないことが示された。また、HPLC 法と UV-VIS 法で測定した抗酸化能は抽出液添加量に関わらず変化率が一定であり、測定方法間で高い相関が認められた。しかし、UV-VIS 法による結果は、ブランク補正をしたにも関わらず、抗酸化能が HPLC 法よりも約 1.5 倍高く算出された。この点については、今後測定法上における検討課題であると認識している。ひとつの可能性として、共に 520 nm 付近に極大吸収を持つアントシアニン類と DPPH ラジカルを混和した際に何らかの物理化学的な相互作用が起こり、吸光度の低下が生じるためかもしれない。しかしながら、UV-VIS 法でも直線性が認められたことから同一試料間の測定においては相対的な比較が可能であると推察される。また、測定機器間の回帰直線の傾きが、今回の研究ではサンプル間でほぼ一定であることから、適切な補正係数を用いれば、HPLC 法における測定値への変換も可能である。UV-VIS 法は簡便で、迅速な方法であるため、アントシアニン類のような不安定な着色試料の測定においては極めて有用であると判断した。

この研究では着色試料ブルーベリーを測定対象としたが、他の着色食品においても DPPH ラジカル消去活性法による抗酸化能の評価に関して同様の結果が得られるかは、今後の課題として研究を継続する所存である。

謝 辞

本論文の作成にあたり、東金産ブルーベリー（ナイトジェム種）試料を提供いただきました千葉県立農業大学校に謝意を表します。また、ブルーベリー試料採取時にお世話をいただきました千葉県立農業大学校・准教授 塩田あづさ先生に心より感謝申し上げます。

【引用文献】

- 1) Kalt W., Forney CF., Martin A., Prior RL., *J. Agric. Food Chem.*, **47**(11), 4638-44 (1999).
- 2) Tsuda H., Kunitake H., Kawasaki-Takaki R., Nishiyama K., Yamasaki M., Komatsu H., Yukizaki C., *Plants (Basel)*, **15**, 2(1), 57-71 (2013).
- 3) 市原由花理、太田和子、岐阜女子大学紀要、第 41 号、7-10 (2012).
- 4) 関澤春仁、野上紀恵、河野圭助、東北農業研究、第 60 号、225-226 (2007).
- 5) Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T., Terao J., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**(6), 1201-4 (1998).
- 6) 吉田明彦、試料分析講座 食品分析、丸善出版、東京 (2011).
- 7) 沖智之、“食品機能性評価マニュアル集第 II 集”、食品機能性評価支援センター編、71-78 (2008).

Influence of measurement method on DPPH free radical-scavenging activity assessment in blueberry fruit extract - Comparison of HPLC method and UV-VIS method -

Yuma Shibata, Kosuke Ohara, Chihiro Takei, Kaori Matsumoto
Tetsuya Hasegawa, Masayuki Akimoto, Atsushi Mitsumoto

Abstract

Anthocyanins (antioxidants) are abundant in blueberries and might be found effective in the reduction of free radicals in the body. The antioxidant activities of these anthocyanins have been assayed by using the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). An HPLC method and colorimetry method using UV-VIS spectrophotometry (UV-VIS method) has been reported for evaluation of the radical-scavenging activity. The aim of this study was to compare the two ways for measuring antioxidant activities in colored foods as blueberries.

The activity was evaluated by measuring the decrease of DPPH detected 517 nm. We determined the free radical-scavenging activity of blueberries. Both methodologies were applied to determine the free radical scavenging activity of 2 berry species. The results gave good correlation between the radical-scavenging activity determined by HPLC and by conventional colorimetry. However, the activities determined by UV-VIS were 1.5-fold higher than those determined by HPLC at all time. HPLC method is expected to be useful for determining the free radical-scavenging activity in colored foods. On the other hand, the UV-VIS method would be applicable to colored specimens with an appropriate adjustment. UV-VIS method is simple and rapid, and also useful for determining the free radical-scavenging activity even in colored specimens, because anthocyanins are chemically unstable.

Keywords: blueberry, DPPH free radical-scavenging activity, HPLC method, UV-VIS method,
Anthocyanin