

報 文

## フローインジェクション-ルミノール化学発光検出 によるブドウ種子抽出物及びポリフェノール類の 活性酸素種消去能評価

和田 光弘<sup>1</sup>, 加藤 正之<sup>1</sup>, 城戸 浩胤<sup>2</sup>, 中嶋弥穂子<sup>1</sup>,  
黒田 直敬<sup>1</sup>, 中島憲一郎<sup>®1</sup>

フローインジェクション分析 (FIA)-ルミノール化学発光検出による簡便・迅速な活性酸素種 (ROS) に対する消去能の評価法を開発し, これを市販のブドウ種子抽出物及びそれらに含まれることが知られているポリフェノール類に適用した。ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ), 一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ), パーオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ ) 及びスーパーオキシドアニオン ( $\text{O}_2^-$ ) 等の ROS とルミノールとの反応によって生じる化学発光に対して, 抗酸化物質含有試料の添加による減少率を ROS 消去能とした。本 FIA システムは, 1 検体を 1 分以内に測定可能であり, 各 ROS における, 抗酸化物質含有試料を未添加時のブランク発光の精度も良好であった (相対標準偏差  $\leq 4.5\%$ ,  $n = 5$ )。用量-反応曲線から算出したシアニジンの  $\text{EC}_{50}$  値 ( $n = 3$ ) はそれぞれ  $50 \pm 4$  ng/assay ( $\cdot\text{OH}$ ),  $148 \pm 8$  ( $^1\text{O}_2$ ),  $36 \pm 4$  ( $\text{ONOO}^-$ ) 及び  $95 \pm 8$  ( $\text{O}_2^-$ ) であった。カルコンを除くペラルゴニン, デルフィニン及びレスベラトロール等のポリフェノール類も ROS に対する強い消去能を示した。また, ブドウ種子抽出物でも同様な ROS 消去能が観察された。

### 1 緒 言

近年, 国民の健康への関心が高まりをみせ, 健康補助食品や機能性食品の摂取により疾病を予防しようという試みが盛んになされてきている。その中でも抗酸化能あるいは活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 消去能を有する食品あるいは添加物が注目を集めており, これに伴い, その効果を標榜するものが数多く市販されている。例えば以前から抗酸化作用を有することが知られているブドウ種子抽出物等の天然抗酸化物は, 食品添加物やいわゆる健康食品として多く市場に出回っている<sup>1)2)</sup>。よってこれらの品質評価及び管理のための簡便かつ迅速な抗酸化能測定法の開発が望まれている。

これまでに食品の抽出物あるいはその成分の抗酸化能を評価する方法は数多く報告されている<sup>3)</sup>。電子スピン共鳴法は 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide 等のスピントラップ剤を用いることにより, ラジカル種を選択的に測定することができる。これにより生体中でのポリフェノール類のラジカル捕捉能<sup>を</sup>を評価することが可能である<sup>4)5)</sup>。またフリ

ーラジカル発生試薬として 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate を用いるブドウ種子抽出物のラジカル捕捉能測定法<sup>6)~9)</sup>やチオバルビツール酸法によるポリフェノール<sup>10)</sup>及びブドウ種子抽出物<sup>11)</sup>の抗酸化能測定法が報告されている。一方, ルミノールや 2-methyl-6-(*p*-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one を用いる化学発光法も報告されている。これにより, プロブコール等のフェノール性抗酸化物<sup>12)</sup>, フラボノール類<sup>13)</sup>, 漢方製剤中の有効成分<sup>14)</sup>及びメラトニン<sup>15)</sup>の抗酸化能が測定されている。著者らはこれまでにルミノール化学発光法を用いたバッチ法による ROS 消去能測定法を開発し, 医薬品とその代謝物<sup>16)</sup>, 食品添加物である水溶性あるいは非水溶性ローズマリー抽出物<sup>17)</sup>及び天然着色料<sup>18)</sup>に適用してきた。しかし, バッチ法は簡便かつ高感度な測定法であるが, 一検体測定のために比較的多量の試薬と測定時間を必要とし, 精度が十分でないなどの問題点を有している。最近, シーケンシャルインジェクション-ルミノール化学発光分析法による ROS 消去能の測定法が開発され<sup>19)</sup>, これをマルチビタミンサプリメントの一重項酸素消去能の評価に適用することができた<sup>20)</sup>。しかしこれらの方法は簡便, 迅速ではあるが, 測定に比較的高価で複雑な装置を必要とするなどの問題点を有している。

本研究では, 測定精度及び迅速性に優れたフローインジ

<sup>1</sup> 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻: 852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

<sup>2</sup> 三菱化学株式会社機能化学品カンパニー: 227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000

エクシオン分析 (FIA)-ルミノール化学発光検出による ROS 消去能の測定法を確立し、これを食品添加物あるいはサプリメントに適用することを目的としている。対象となる ROS にはヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )、一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ )、パーオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ ) 及びスーパーオキシドアニオン ( $\text{O}_2^-$ ) を用いた。今回は抗酸化試料として、市販のブドウ種子抽出物とそれらに含まれるカルコン及びポリフェノール類 (ペラルゴニジン, シアニジン, デルフィニジン及びレスベラトロール) を用いて、各 ROS に対する消去能を測定した。

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

キサンチンオキシダーゼ (XOD, バターミルク由来),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%),  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{NaNO}_2$  は和光純薬製を用いた。カルコン, ペラルゴニジン, シアニジン及びデルフィニジンはフナコシ製を用いた。ルミノール, ヒポキサンチン (HX),  $\text{NaBr}$ , ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DETA-PAC) ラクトペルオキシダーゼ (LPO) 及びトランス-レスベラトロールは Sigma (St Louis, MO, USA) 製を用いた。その他の試薬はいずれも特級を用いた。水は Aquarius GSR-500 自動蒸留装置 (アドバンテック製) にて蒸留したものを実験に使用した。

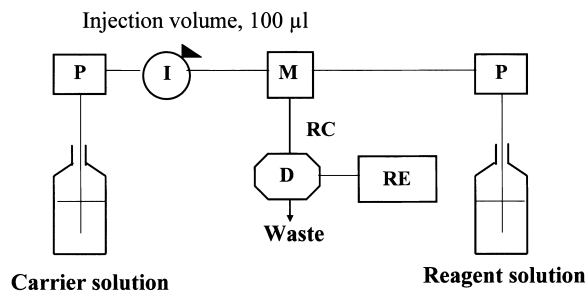


Fig. 1 Diagram of the FIA system for measurement of quenching effect

P: Pump; I: injector; M: T-joint mixing; RC: reaction coil; D: CL detector; RE: recorder

実験に用いた市販のブドウ種子抽出物 (grape seed extract, GSE) A 及び B は三菱化学から入手した。これらの抽出物あるいはポリフェノール類は適当な濃度になるようジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解し ( $\cdot\text{OH}$  の場合はジメチルホルムアミド (DMF)), 分析まで  $-10^\circ\text{C}$  で保存した。

### 2.2 フローインジェクション分析システム

化学発光測定に用いた FIA システムのダイアグラムを Fig. 1 に示す。本システムはキャリアー溶液及び ROS 発生の引き金となる試薬溶液を送液する 2 台の LC-6A 型 HPLC 用ポンプ (島津製作所製), レオダイン製 7125 型インジェクター (Cotati, CA, USA), 825-CL 型化学発光検出器 (日本分光製) 及び R-61 型記録計 (理化電器製) から成る。キャリアー溶液と試薬溶液を混和後, 検出セルに至るまでの反応コイルには, 230 mm ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  及び  $\text{O}_2^-$ ) 及び 120 mm ( $\cdot\text{OH}$ ) のテフロン製コイル ( $\phi$  0.25 mm) を用いた。試料注入料は 100  $\mu\text{l}$  とした。各 ROS 消去能測定に用いたキャリアー溶液及び試薬溶液の組成及びそれらの流量を Table 1 に示す。

### 2.3 試料溶液の調製

各 ROS 消去能を測定するための試料溶液は以下に示す手順により調製した。 [ $\cdot\text{OH}$ ] 抗酸化試料/DMF 溶液 5  $\mu\text{l}$ , 1.2 mM ルミノール/リン酸塩緩衝液 (100 mM, pH 8.3) 及び 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /リン酸塩緩衝液, 各 500  $\mu\text{l}$  を試験管 ( $\phi$  12  $\times$  75 mm) に加え, 混和し,  $37^\circ\text{C}$ , 10 分間インキュベートしたものを試料溶液とした。 [ $^1\text{O}_2$ ] 抗酸化試料/DMSO 溶液 6  $\mu\text{l}$  に 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /酢酸塩緩衝液 (100 mM, pH 4.5), 80 mM  $\text{NaBr}$ /酢酸塩緩衝液及び 0.1 mM ルミノール/酢酸塩緩衝液をそれぞれ 400  $\mu\text{l}$  加え, 混和後  $37^\circ\text{C}$ , 10 分間インキュベートし, これを試料溶液とした。 [ $\text{ONOO}^-$ ] 抗酸化試料/DMSO 溶液 5  $\mu\text{l}$ , 1.2 mM ルミノール/リン酸塩緩衝液 (100 mM, pH 8.3) 及び 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /リン酸塩緩衝液, 各 500  $\mu\text{l}$  を混和し,  $37^\circ\text{C}$ , 10 分間インキュベートしたものを試料溶液とした。 [ $\text{O}_2^-$ ] 抗酸

Table 1 FIA conditions for carrier and reagent solutions of the proposed method

ROS	Carrier solution	Reagent solution
$\cdot\text{OH}$	100 mM phosphate buffer (pH 7.4) Flow rate: 0.5 ml min <sup>-1</sup>	100 $\mu\text{M}$ $\text{FeCl}_2$ and 4 mM DETAPAC/phosphate buffer Flow rate: 0.3 ml min <sup>-1</sup>
$^1\text{O}_2$	100 mM acetate buffer (pH 4.5) Flow rate: 0.5 ml min <sup>-1</sup>	10 $\mu\text{g/ml}$ LPO/acetate buffer Flow rate: 0.1 ml min <sup>-1</sup>
$\text{ONOO}^-$	100 mM phosphate buffer (pH 8.3) Flow rate: 0.4 ml min <sup>-1</sup>	2 mM $\text{NaNO}_2$ /phosphate buffer Flow rate: 0.4 ml min <sup>-1</sup>
$\text{O}_2^-$	100 mM phosphate buffer (pH 8.3) Flow rate: 0.5 ml min <sup>-1</sup>	1 mM HX/phosphate buffer Flow rate: 0.1 ml min <sup>-1</sup>

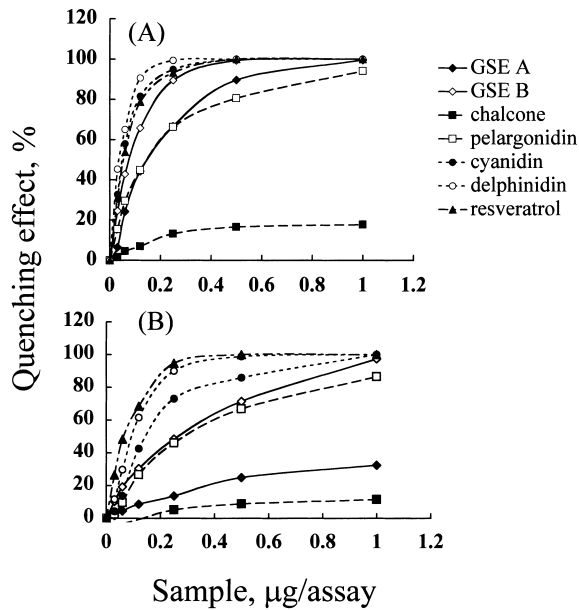


Fig. 2 Quenching effects of GSEs and polyphenolics against  $\cdot\text{OH}$  (A) and  $^1\text{O}_2$  (B)

Sample concentrations: (A) 0.031 ~ 0.50  $\mu\text{g}/\text{assay}$ ; (B) 0.031 ~ 1.0  $\mu\text{g}/\text{assay}$ . FIA conditions were shown in Experimentals.

化試料/DMSO 溶液 5  $\mu\text{l}$ , 0.05 unit/ml XOD/リン酸塩緩衝液 (100 mM, pH 8.3) 及び 1.2 mM ルミノール/リン酸塩緩衝液, 各 500  $\mu\text{l}$  を混和後 37°C, 10 分間インキュベートしたものを試料溶液とした。

#### 2.4 ROS 消去能の測定

ROS 消去能は, 抗酸化試料を含まない (DMSO, DMF のみ添加) 場合の化学発光強度 (ピーク高,  $\text{CI}_0$ ) に対する,  $\text{CI}_0$  から抗酸化試料添加時の化学発光強度 (ピーク高,  $\text{CI}$ ) を差し引いた値の割合として算出している。また  $\text{CI}_0$  を 50% 消去する場合の基質濃度を用量-反応曲線から算出し,  $\text{EC}_{50}$  値とした ( $n = 3$ )。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 FIA 条件

各 ROS 消去能測定のため, キャリアー溶液, 試薬溶液の流量, 反応コイル長及びルミノール濃度の FIA 条件の最適化を行った。

まず,  $\cdot\text{OH}$  に対する消去能測定法において, キャリアー溶液の流量が  $\text{CI}_0$  に与える影響について検討を行った。0.3 ~ 1.2 ml/min の範囲で測定したところ, 0.4 ~ 0.7 ml/min でほぼ一定の  $\text{CI}_0$  を示し, 0.8 ml/min 以上で減少した。そこで以後の検討には 0.5 ml/min を用いることにした。次に, 試薬溶液の流量が発光強度に与える影響について検討を行った。0.1 ~ 0.5 ml/min の範囲で測定したと

ころ, 0.3 ml/min までは流量の上昇に伴い,  $\text{CI}_0$  の増加が観察された。ここでは, 最大の  $\text{CI}_0$  を示した 0.3 ml/min を選択した。次に反応コイル長さの検討を行った。反応コイルは, 内径 0.25 mm のステンレススチール製のものを用いた。その結果, 長さ 120 mm (混和後 0.4 秒での測定に相当) で最大の  $\text{CI}_0$  を示し, その後, 反応コイルの延長と共に  $\text{CI}_0$  は減少した。最後にルミノール濃度の化学発光強度に与える影響について検討を行った。0.1 mM から 2 mM の範囲で測定したところ, 濃度の上昇と共に  $\text{CI}_0$  も上昇し, 1 mM 以上で最大かつ一定の  $\text{CI}_0$  を示した。そこで 1.2 mM ルミノール溶液を用いて以後の検討を行った。

$^1\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  及び  $\text{O}_2^-$  についても同様の検討を行い, 得られた最適条件を Table 1 に示した。これらの ROS に対する消去能測定系では, 230 mm (混和後 0.9 あるいは 1.1 秒での測定に相当) の反応コイルを用いた場合に最大の  $\text{CI}_0$  が得られた。

本 FIA 法は, 1 検体の測定時間が 1 分以内と短く, かつ  $\text{CI}_0$  の繰り返し測定における精度は相対標準偏差 (RSD) でそれぞれ 4.5% ( $\cdot\text{OH}$ ,  $n = 5$ ), 2.5% ( $^1\text{O}_2$ ,  $n = 5$ ), 1.8% ( $\text{ONOO}^-$ ,  $n = 5$ ) 及び 2.0% ( $\text{O}_2^-$ ,  $n = 5$ ) であり, 迅速かつ高精度な測定が可能であった。これらを著者らが以前報告した化学発光法を利用するバッチ法と比較すると, その測定時間 (約 2 分/試料) 及び精度 (約 10%) はそれぞれ改善されていた<sup>18)</sup>。更に 1 検体の測定に必要な総試薬量を約 1/10 に抑えることができ, 経済性にも優れていた。Choi らは FIA-ルミノール化学発光法を用いてフラボノイド類の抗酸化能を評価し, B 環の水酸基の数が抗酸化能に強く影響していることを報告した<sup>14)</sup>。しかしこれは  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する抗酸化能のみを評価できるだけであり, 本法では生体に関連する 4 種の ROS の消去能評価が可能であった。シーケンシャルインジェクション法についても次亜塩素酸イオン及び  $\text{O}_2^-$  の消去能測定法を報告しているのみである<sup>19)20)</sup>。Sariahmetoglu らは FIA-ルミノール化学発光法によるメラトニンの 5 種類の ROS 消去能を報告している<sup>15)</sup>。しかしキャリアー溶液及び試薬溶液の総流量が 5.0 ml/min と多く, 多量の試薬が必要である。

#### 3.2 ブドウ種子抽出物及びポリフェノール類の活性酸素種消去能の測定

次に本 FIA システムを市販のブドウ種子抽出物及び代表的なポリフェノール類の ROS 消去能測定に適用した。ポリフェノール類は 0.02 ~ 2 mg/ml となるよう調製し, 実験に供した。

まず,  $\cdot\text{OH}$  消去能を測定したところ, GSE 及びポリフェノール類の発光強度は試料濃度の増加に伴い, 減少していった (Fig. 2-A)。2 種の GSE はいずれも検討した試料の内, 中程度の抗酸化作用を示した。ポリフェノール類

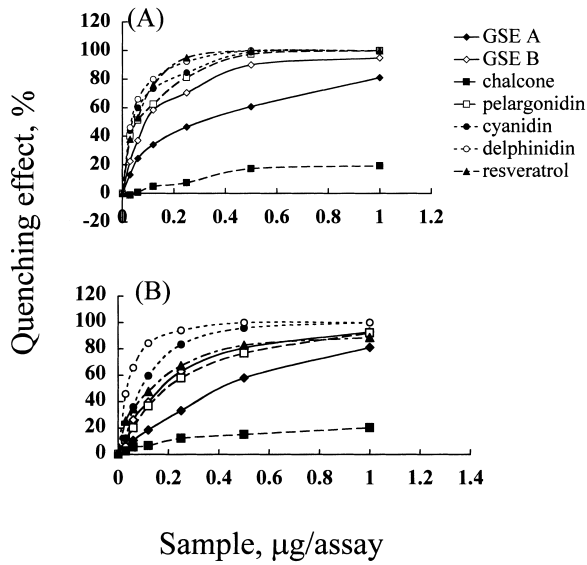


Fig. 3 Quenching effects of GSEs and polyphenolics against ONOO<sup>-</sup> (A) and O<sub>2</sub><sup>-</sup> (B)

Sample concentrations: 0.031 ~ 1.0 μg/assay. FIA conditions were shown in Experimentals.

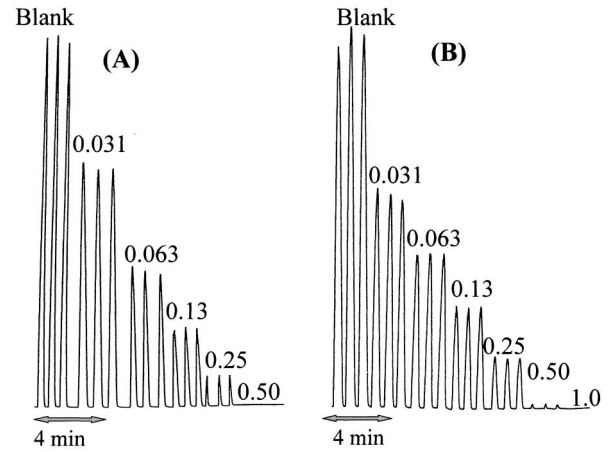


Fig. 4 Recorder responses of cyanidin against ·OH (A) and ONOO<sup>-</sup> (B)

The numbers above peaks showed the sample concentrations (μg/assay). FIA conditions were shown in Experimentals.

Table 2 EC<sub>50</sub> of GSEs, chalcone, flavonoids and *trans*-resveratrol against ROS

Sample	EC <sub>50</sub> , mean ± SD ng/assay (n = 3)			
	·OH	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	ONOO <sup>-</sup>	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
GSE A	140 ± 30	*	285 ± 34	365 ± 24
GSE B	71 ± 4	210 ± 10	87 ± 11	164 ± 10
chalcone	*	*	*	*
pelargonidin	140 ± 14	263 ± 14	49 ± 8	179 ± 16
cyanidin	50 ± 4	148 ± 8	36 ± 4	95 ± 8
delphinidin	36 ± 4	92 ± 6	33 ± 4	36 ± 4
<i>trans</i> -resveratrol	53 ± 3	64 ± 5	49 ± 4	123 ± 14

\* > 1000 ng/assay

中ではデルフィニジンで最も強い消去能がみられたが、カルコンでは、1 μg/assay を用いた場合でも 20% 以下の消去能しか示さなかった。次に <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 消去能を測定した (Fig. 2-B)。その結果、GSE A は B に比べるとその抗酸化作用は低かった。またレスベラトロールで最も強い <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 消去能がみられた。ONOO<sup>-</sup> 消去能 (Fig. 3-A) は、デルフィニジンで最も強い ONOO<sup>-</sup> 消去能がみられた。2 種類の GSE はここでも抗酸化作用を示したが、その順序は GSE A < GSE B であった。Fig. 3-B は O<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去能の測定結果を示しており、GSE は中程度の抗酸化作用を示し、その順序は GSE A < GSE B であった。ポリフェノール類ではデルフィニジンが最大の消去能を示した。Fig. 4

(Table 2)。GSE A の <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 消去能及びカルコンの 4 種の ROS 消去能は、今回測定したサンプル濃度において消去能が低く EC<sub>50</sub> 値を算出することができなかった。GSE A の EC<sub>50</sub> 値は 140 ~ 365 ng/assay であり、GSE B は 71 ~ 210 ng/assay とその値は広範囲に及んだ。ポリフェノール類に関しては <sup>1</sup>O<sub>2</sub> では、レスベラトロールが最も強く、·OH、ONOO<sup>-</sup> 及び O<sub>2</sub><sup>-</sup> では、デルフィニジンが最も強かった。先に報告したバッチ法の結果<sup>18)</sup>と今回の結果を比較すると、アントシアニン系化合物による·OH 及び O<sub>2</sub><sup>-</sup> の消去能は、いずれも、デルフィニジン > シアニジン > ペラルゴニジンの順に強い消去能を示し一致していた。バッチ法での O<sub>2</sub><sup>-</sup> に対する EC<sub>50</sub> 値は > 12 μg/assay (ペラルゴニジン)、2.9 μg/assay (シアニジン) 及び 0.6 μg/assay (デルフィニジン) であり、FIA 法の結果と異なっていた。これは測定系内での ROS 量の違いによると考えられた。一方、Wood らはブドウ種子及び果皮抽出物の

抗酸化作用に対する pH の影響を  $O_2^-$  消去能を指標に検討を行い<sup>21)</sup>, フラボノイド類の抗酸化能の強さは酸性溶液 (pH 2.5) < 水 < アルカリ溶液 (pH 8.0) となる傾向を示すと報告している. 今回得られた結果は必ずしもその順序が一致しておらず, 基質と ROS との反応性の違いが影響するものと推察された.

#### 4 結 言

FIA-ルミノール化学発光検出法によるブドウ種子抽出物とそれに含まれるカルコン, ペラルゴニジン, シアニジン, デルフィニジン及びレスベラトロールによる ROS 消去能を測定した. 今回開発した FIA 法は簡便, 迅速かつ安価に ROS 消去能測定が可能であり, 実際の機能性食品や食品添加物等の品質評価に有用であった. ブドウ種子抽出物 (GSE A の  $^1O_2$  を除く) の ROS 消去能は, それに含まれるポリフェノール類と共にそれぞれ  $EC_{50}$  値を算出し, 評価することができた. また, 各 ROS 消去能測定に関する基礎データは, 複数のシステムを組み合わせることで, 1 回の試料注入により複数の ROS 消去能を測定可能なシステムの構築に役立つものと考えられる.

#### 文 献

- 1) M. N. Clifford: *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1063 (2000).
- 2) M. B. Mielnik, E. Olsen, G. Vogt, D. Adeline, G. Skrede: *LWT*, **39**, 191 (2006).
- 3) O. I. Arouma: *Mutat. Res.*, **523-524**, 9 (2003).
- 4) M. Bergman, A. Perelman, Z. Dubinsky, S. Grossman: *Phytochemistry*, **62**, 753 (2003).
- 5) S. S. Leonard, C. Xia, B. H. Jiang, B. Stinefelt, H. Klandorf, G. K. Harris, X. Shi: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **309**, 1017 (2003).
- 6) J. C. Espin, C. Soler-Rivas, H. J. Wichers, C. Garcia-Viguera: *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1588 (2000).
- 7) J. Yokota, D. Takuma, A. Hamada, M. Onogawa, S. Yoshioka, M. Kusunose, M. Miyamura, S. Kyotani, Y. Nishioka: *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 467 (2006).
- 8) G. K. Jayaprakasha, T. Selvi, K. K. Sakariah: *Food Res. Intern.*, **36**, 117 (2003).
- 9) S. Y. Kim, S. M. Jeong, W. P. Park, K. C. Nam, D. U. Ahn, S. C. Lee: *Food Chem.*, **97**, 472 (2006).
- 10) T. Kayashima, T. Katayama: *Biochim. Biophys. Acta*, **1573**, 1 (2002).
- 11) H. S. Ahn, T. I. Jeon, J. Y. Lee, S. G. Hwang, Y. Lim, D. K. Park: *Nutr. Res.*, **22**, 1265 (2002).
- 12) O. Cynshi, Y. Takashima, Y. Katoh, K. Tamura: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **10**, 261 (1995).
- 13) L. Selloum, H. Djelili, L. Sebihi, J. Arnhold: *Luminescence*, **19**, 199 (2004).
- 14) H. Y. Choi, E. J. Jhun, B. O. Lim, I. M. Chung, S. H. Kyung, D. K. Park: *Phytother. Res.*, **14**, 250 (2000).
- 15) M. Sariahmetoglu, R. A. Wheatley, Y. Cakycy, A. Townshend: *Pharmacol. Res.*, **48**, 361 (2003).
- 16) A. Nakashima, M. Ohtawa, K. Iwasaki, M. Wada, N. Kuroda, K. Nakashima: *Life Sci.*, **69**, 1381 (2001).
- 17) M. Wada, H. Kido, K. Ohyama, N. Kishikawa, Y. Ohba, N. Kuroda, K. Nakashima: *Food Chem.*, **87**, 261 (2004).
- 18) M. Wada, H. Kido, K. Ohyama, T. Ichibangase, N. Kishikawa, Y. Ohba, M. N. Nakashima, N. Kuroda, K. Nakashima: *Food Chem.*, **101**, 980 (2007).
- 19) 中村訓子, 大庭義史, 岸川直哉, 黒田直敬: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 925 (2004).
- 20) A. Miyamoto, K. Nakamura, Y. Ohba, N. Kishikawa, K. Nakashima, N. Kuroda: *Anal. Sci.*, **22**, 73 (2006).
- 21) J. E. Wood, S. T. Senthilmohan, A. V. Peskin: *Food Chem.*, **77**, 155 (2002).

## Flow Injection Analysis with Luminol Chemiluminescence Detection for Evaluation of Quenching Effects of Grape Seed Extracts and Polyphenolics against Reactive Oxygen Species

Mitsuhiro WADA<sup>1</sup>, Masayuki KATO<sup>1</sup>, Hirotsugu KIDO<sup>2</sup>, Mihoko N. NAKASHIMA<sup>1</sup>,  
Naotaka KURODA<sup>1</sup> and Kenichiro NAKASHIMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Biomedical Sciences, Course of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521

<sup>2</sup> Mitsubishi Chemical Corporation, Specialty Chemicals Company, 1000, Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 227-8502

(Received 12 July 2006, Accepted 27 October 2006)

A simple and rapid FIA method for measurement of quenching effects of grape seed extracts and polyphenolics against reactive oxygen species (ROS) was developed. This method is based on the determination of luminol chemiluminescence generated with ROS such as hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) and superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ). More than 1 sample/min could be measured with satisfactory precision. The total reagent amount in this method could be reduced to one tenth of that for our previous batch method. The grape seed extracts A and B were successfully evaluated by the proposed method. The  $\text{EC}_{50}$  of cyanidin as a representative polyphenolic against  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  and  $\text{O}_2^-$  were  $50 \pm 4$ ,  $148 \pm 8$ ,  $36 \pm 4$ , and  $95 \pm 8$  ng/assay ( $n = 3$ ), respectively. Except for chalcone, the other polyphenolics such as pelargonidin, delphinidin and *trans*-resveratrol also showed the high quenching effects against ROS.

**Keywords** : flow injection analysis; chemiluminescent assay; grape seed extract; polyphenolics; reactive oxygen species.