

ールを添加した場合の吸光度をコントロールとした。また、DPPH 溶液の代わりにエタノール、あるいは超純水を添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率(%)を求めた。

試料の DPPH ラジカル消去活性は 6-hydroxy-5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid 等価活性、すなわち、Trolox 等価活性 (TEAC) で示した。TEAC とは IC_{50} を示す Trolox 濃度 (mg/ml) と IC_{50} を示す試料濃度 (mg/ml) が等しい活性を有するものとみなし、試料 1mg あたりの活性を Trolox 等量に換算したものである。

(2) ABTS ラジカル消去活性

Fellengrini らの方法で行った²⁾。7mM ABTS 水溶液 5ml に 140mM 過硫酸カリウム 88ul を加え、暗所で室温にて 12~16 時間インキュベートした。この溶液を ABTS stock solution とし、734nm の吸光度が 0.7 ± 0.02 になるようにエタノールで希釈した。これを ABTS working solution とした。試験管に ABTS working solution 1ml を分注し、そこに試料 10ul を添加して、10 秒間激しく攪拌し、30°C で 4 分間インキュベートした。その後、734nm における吸光度を測定した。試料溶液の代わりに超純水、またはエタノールを添加した場合の吸光度をコントロールとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率(%)を求めた。その後、各試料について TEAC を求め、その値を ABTS ラジカル消去活性とした。

(3) SOSA

SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所製) の使用方法を一部改変して行った。96 穴マイクロプレートに 20 μ l の試料溶液、200 μ l の

WST-W 溶液、20 μ l の WST-E 溶液を順次添加し、マイクロプレートリーダーで攪拌した。WST-E 溶液の添加から 10 分後にマイクロプレートリーダーで 450 nm における吸光度を測定した。試料の代わりに超純水を添加した際の吸光度をブランク 1、WST-E の代わりに dilution buffer を添加した場合の吸光度をブランク 2 (試料添加時)、ブランク 3 (超純水添加時) とした。ブランク 1 の吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率(%)を求めた。

試料の SOSA は、スーパーオキシドジスムターゼ等価活性、すなわち SOD 等価活性で示した。SOD 等価活性とは IC_{50} をもたらす SOD 濃度 (Units/ml) と IC_{50} をもたらす試料濃度 (mg/ml) が等しい活性を有するとみなし、試料 1mg あたりの SOSA を SOD 単位 (Units/mg) で示したものである。

(4) 共同試験

3 研究室共同試験では、各化合物のロットを合わせ、試薬秤取の基準量、用いる計容器具の基準、データ解析法を合わせて行った。

C. 研究結果

(1) 単一化合物抗酸化活性評価

(a) DPPH ラジカル消去活性

DPPH ラジカル消去活性の測定結果を表 1 に示す。DPPH ラジカル消去活性の強さは、平成 17 年度の結果と同様に、最も強い化合物は、没食子酸であり、続いて、エラグ酸、ケルセチン、カテキン、セサモールが中間活性化合物であり、フェルラ酸、モリン、*d*- α -トコフェロール、*d*- δ -トコフェロールが低活性化合物であった。3 研究室間では、表 1 に示すように、各 2 研究室間の分散、平均値検定では、等価 (有意差なし) と見做せるもの

は少なかったが、表4に示すように、全単一化合物に対する平均値の検定 (paired-t) では、K 研究室と Q 研究室間で有意差ありと判定された以外は、ほぼ一致していると思われた。相関係数 (r) も 0.95 以上であり、比較的良好的な一致性を示した。

(b) ABTS ラジカル消去活性

ABTS ラジカル消去活性の測定結果を表2に示す。ABTS ラジカル消去活性の強さは、平成17年度の結果とほぼ同一であり、DPPH ラジカル消去活性と同じ傾向であった。3研究室間では、表2に示すように、各2研究室間では、エラグ酸、モリンを除いて、その分散はほぼ等価 (有意差なし) と見做されるが、平均値の検定では有意差が認められた。しかしながら、表4に示すように、全単一化合物に対する平均値の検定 (paired-t) では、3研究室間で有意差はなく、N 研究室と K 研究室で高い相関を示した。

(c) SOSA

SOSA 測定結果を表3に示す。平成17年度の結果と同様に没食子酸が特に高い活性を示し、他の単一化合物抗酸化剤の SOSA 活性は、DPPH 活性、ABTS 活性とほぼ同じ傾向であった。3研究室間では、フェルラ酸とモリンが N 研究室で測定不能であった。各研究室間では、カテキンの分散がいずれの研究室間でも有意差ありとなり、分散に大きなずれがあった。しかしながら、表4に示すように、全単一化合物に対する平均値の検定 (paired-t) では、3研究室間で有意差はなく、相関係数 (r) も高く比較的良い一致性を示した。

(2) 天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価

天然物酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性、ABTS ラジカル消去活性及び SOSA 測

定結果を表5に示す。単一化合物以外で、抗酸化活性の高かった物質は、チャ抽出物 (茶抽出物-70)、チャ抽出物 (サンフェノン 90S)、ブドウ種子抽出物であった。中間活性を示す物質としては、酵素処理ルチン (抽出物)、チャ抽出物 (サンフード 100)、緑茶エキス、ヤマモモ抽出物、酵素処理イソクエルシトリン、ルチン (抽出物) であった。ルチン酵素分解物、単糖・アミノ酸複合物、ローズマリー抽出物 (光洋)、 γ -オリザノールは測定できなかった (白濁あるいは溶媒に不溶)。

D. 考察

単一化合物については、DPPH ラジカル消去活性、ABTS ラジカル消去活性ならびに SOSA 測定ともに、抗酸化性の強さでは、ほぼ同じ傾向が認められ、3測定法とも抗酸化活性測定に有用な方法であると考えられた。共同試験の結果は、3測定法それぞれでバラツキはあるものの、全単一化合物に対する平均値の検定 (paired-t) では、一例を除き等価 (有意差なし) と判定された。表1最下段に示すように、DPPH ラジカル消去活性測定における Q 研究室の Trolox 活性が、他の K、N 研究室に比較して高く測定されており、この影響が K 研究室と Q 研究室間の平均値検定 (paired-t) 結果に表れたものと思われる。N 研究室と K 研究室間の測定値は概して良く一致しており、全単一化合物に対する平均値の相関係数 (r) も比較的高かった。SOSA 測定については、標準物質である SOD を化合物ごとに毎回基準として測定する場合と、最初に測定した値を各化合物に対して使う場合で結果に違いが表れるものと思われ、次年度以降打ち合わせを徹底する。今後は、5研究室～8研究室での共同試験が望まれる。

天然物酸化防止剤抗酸化活性評価の結果、DPPH ラジカル消去活性、ABTS ラジカル消去活性、SOSA 測定とも抗酸化力評価に有用であると考えられた。天然物酸化防止剤によっては、溶媒不溶あるいは白濁のため測定不能なものがあり、酸化防止剤によっては上記3測定法を使い分ける必要があると考えられた。

E. 結論

各単一化合物酸化防止剤の活性の高低の傾向は、3つの評価系で概して一致しており、3研究室間でもほぼ同じ傾向を示した。この結果から、これらの評価系はいずれも抗酸化活性の評価方法として適していると判断された。天然物酸化防止剤についても、これら3評価系は適用可能であると判断された。今

後、各天然物酸化防止剤の組み合わせによる抗酸化活性の相乗効果あるいは減弱効果などを試験するとともに、共同試験室数を増した調査が必要である。

F. 研究発表

(1) 論文発表

なし

(2) 学会発表

なし

参考文献

- 1) H.S. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4156-4161 (2000).
- 2) N. Fellengrini et al., *Meth. Enzymol.*, **299**, 379-389 (1999).

表1 単一化合物酸化防止剤の DPPH (TEAC)法による抗酸化活性評価 (3 研究室共同試験)

単一化合物	Q 研究室	N 研究室	K 研究室	RSD _f (%)	RSD _R (%)	Q vs. N	N vs. K	K vs. Q
カテキン	2.66±0.032	2.45±0.083	1.86±0.102	3.29	18.10	F=6.75, t=4.34	F=1.63, t=7.93	F=11.0, t=13.1
ケルセチン	3.28±0.091	2.82±0.354	2.66±0.023	8.63	13.45	F=22.5, t=2.01	F=284, t=0.52	F=12.7, t=11.7
セサモール	1.88±0.006	1.47±0.078	1.72±0.054	3.13	12.29	F=172, t=9.20	F=2.17, t=4.61	F=79.0, t=5.37
フェルラ酸	1.03±0.005	0.87±0.025	0.87±0.006	1.80	9.89	F=7.00, t=9.80	F=21.0, t=0.31	F=3.00, t=23.0
没食子酸	4.52±0.126	3.66±0.204	3.70±0.070	3.69	12.62	F=2.62, t=6.13	F=8.71, t=0.32	F=3.33, t=9.75
モリン	1.10±0.072	0.90±0.043	0.90±0.019	5.12	12.60	F=3.20, t=4.25	F=3.77, t=0.38	F=12.1, t=4.45
エラグ酸	3.13±0.119	3.63±0.230	3.63±0.117	4.74	9.16	F=3.39, t=3.32	F=3.90, t=0.02	F=1.03, t=5.21
α-トコフェロール	1.10±0.018	0.54±0.044	0.57±0.003	3.81	42.85	F=6.78, t=20.0	F=61.0, t=0.89	F=4.28, t=50.6
δ-トコフェロール	0.71±0.012	0.58±0.051	0.58±0.014	5.08	12.48	F=10.9, t=4.28	F=10.9, t=0.22	F=1.00, t=9.89
トロロックス(μgml ⁻¹)	7.00±0.264	6.34±0.374	6.31±0.096

F 境界値: Fo=19, t 境界値: to=2.78, 3.18, 4.30, RSD_f: 併行相対標準偏差, RSD_R: 室間再現相対標準偏差

表2 単一化合物酸化防止剤の ABTS(TEAC) 法による抗酸化活性評価 (3 研究室共同試験)

単一化合物	Q 研究室	N 研究室	K 研究室	RSD _f (%)	RSD _R (%)	Q vs. N	N vs. K	K vs. Q
カテキン	2.14±0.051	0.98±0.038	0.90±0.036	3.16	52.06	F=1.84, t=31.7	F=1.10, t=2.54	F=2.03, t=34.3
ケルセチン	1.88±0.044	2.45±0.075	1.37±0.045	3.34	27.74	F=4.23, t=9.32	F=3.95, t=18.0	F=1.07, t=14.0
セサモール	3.33±0.075	3.80±0.95	3.70±0.045	2.01	7.10	F=1.57, t=6.78	F=7.24, t=1.72	F=4.62, t=7.77
フェルラ酸	1.90±0.136	0.36±0.053	0.69±0.040	8.90	82.68	F=6.62, t=18.2	F=1.75, t=8.62	F=11.6, t=14.7
没食子酸	3.97±0.241	3.63±0.089	3.49±0.061	4.12	7.44	F=7.33, t=2.30	F=2.12, t=2.19	F=15.5, t=3.33
モリン	0.80±0.025	0.82±0.040	0.80±0.006	3.44	3.40	F=2.56, t=0.97	F=49.0, t=1.13	F=19.0, t=1E-14
エラグ酸	2.88±0.320	2.25±0.006	2.25±0.025	7.53	15.99	F=3073, t=3.41	F=19.0, t=0.00	F=162, t=3.40
α-トコフェロール	0.50±0.015	0.61±0.017	0.58±0.015	2.84	9.96	F=1.29, t=8.00	F=1.29, t=2.50	F=1.00, t=5.88
δ-トコフェロール	0.60±0.015	0.73±0.010	0.67±0.006	2.84	10.13	F=2.33, t=12.6	F=3.00, t=9.50	F=7.00, t=7.42
トロロックス(μgml ⁻¹)	3.67±0.251	3.18±0.378	2.92±0.020

F 境界値: Fo=19, t 境界値: to=2.78, 3.18, 4.30

表3 単一化合物酸化防止剤のSOSA (Units/mg) 法による抗酸化活性評価 (3研究室共同試験)

単一化合物	Q 研究室	N 研究室	K 研究室	RSD _R (%)	Q vs. N	N vs. K	K vs. Q
カフェイン	54.8±10.4	40.8±1.44	31.6±0.07	14.34	F=52.0, t=2.30	F=397, t=11.1	F=20970, t=3.80
ケルセチン	16.3±3.91	8.90±1.71	20.0±1.69	16.25	F=5.25, t=3.11	F=1.02, t=8.96	F=5.36, t=1.50
セサモール	0.18±0.02	0.08±0.01	0.20±0.03	13.81	F=3.37, t=7.49	F=6.06, t=7.03	F=1.80, t=0.98
フェルラ酸	3.83±0.52	N.D.	4.66±0.46	11.68*	-----	-----	F=1.26, t=2.06
没食子酸	1072±206	324±59.8	916±68.4	15.87	F=11.8, t=6.10	F=1.31, t=11.9	F=9.06, t=1.24
モリン	5.60±1.59	N.D.	3.96±0.95	27.43*	-----	-----	F=2.80, t=1.53
エラズ酸	55.3±11.3	133.4±29.3	186.6±28.4	18.59	F=5.36, t=4.73	F=1.17, t=2.38	F=6.25, t=7.45

F 境界値 : F₀=19, t 境界値 : t₀=2.78, 3.18, 4.30; * 2 研究室

表4 平均値検定 (paired-t 検定) と研究室間相関

	Q vs. N	N vs. K	K vs. Q
DPPH (TEAC)	t=2.22 r=0.958	t=0.63 r=0.984	t=2.34 r=0.948
ABTS (TEAC)	t=1.09 r=0.844	t=1.03 r=0.959	t=2.06 r=0.892
SOD (Unit/mg)*	t=0.93 r=0.956	t=1.17 r=0.989	t=0.33 r=0.985

t 境界値 : t₀=2.30, *5 成分, t 境界値 : t₀=2.78

表5 天然物抗酸化剤の抗酸化性評価

化合物	トロロックス or SOD 等価活性 (IC ₅₀ ± SD (n=3), mg/ml)		
	DPPH 法	ABTS 法	SOD 法 (unit/mg)
エラグ酸	3.13 (2.24 ± 0.08)	2.86 (1.28 ± 0.14)	53.8 (1.35 ± 0.27)
γ-オリザノール	測定不能 (白濁)	0.0987 (37.2 ± 2.3)	測定不能 (ばらつき大)
カテキン	2.66 (2.63 ± 0.03)	2.14 (1.71 ± 0.04)	53.5 (1.36 ± 0.26)
カンゾウ油性抽出物	0.0386 (181 ± 3)	0.0800 (45.9 ± 2.9)	5.48 (48.4 ± 8.9)
酵素処理イソクエルシトリン	0.950 (7.54 ± 0.41)	2.65 (1.38 ± 0.18)	20.2 (8.87 ± 1.51)
酵素処理ルチン (抽出物)	1.09 (6.55 ± 0.60)	0.332 (11.0 ± 0.3)	14.3 (8.80 ± 0.61)
ルチン酵素分解物		溶媒不溶のため測定せず	
コメヌカ油分解物	0.597 (11.7 ± 1.0)	0.972 (3.78 ± 0.03)	沈殿生成のため測定不可
コメヌカ酵素分解物		溶媒不溶のため測定せず	
単糖・アミノ酸複合物	白濁のため測定不可	0.0165 (>223)	0.481 (361 ± 25)
チャ抽出物 A	1.60 (4.48 ± 0.04)	1.33 (2.76 ± 0.18)	339 (0.503 ± 0.123)
チャ抽出物 B	1.69 (4.25 ± 0.04)	1.14 (3.22 ± 0.40)	504 (0.384 ± 0.056)
チャ抽出物 C	2.44 (2.94 ± 0.16)	1.60 (2.30 ± 0.17)	998 (0.214 ± 0.005)
チャ抽出物 D	2.85 (2.46 ± 0.02)	2.11 (1.74 ± 0.01)	1402 (0.148 ± 0.002)
チャ抽出物 E	1.02 (7.00 ± 0.23)	0.834 (4.40 ± 0.08)	246 (0.636 ± 0.070)
トコトリエノール	0.738 (9.48 ± 0.11)	0.555 (6.61 ± 0.26)	測定対象外
d-α-トコフェロール	0.609 (11.5 ± 0.2)	0.541 (6.78 ± 0.54)	測定対象外
d-γ-トコフェロール	0.694 (10.1 ± 0.3)	0.586 (6.27 ± 0.54)	測定対象外
d-δ-トコフェロール	0.549 (12.7 ± 0.4)	0.560 (6.55 ± 0.15)	測定対象外

表5 天然物抗酸化剤の抗酸化性評価 (つづき)

化合物	トロロックス or SOD 等価活性 (IC ₅₀ ±SD (n=3), mg/ml)		
	D P P H法	ABTS 法	SOD 法 (unit/mg)
生コーヒー豆抽出物	0.528 (13.6 ± 0.1)	0.194 (18.9 ± 1.9)	55.9 (2.69 ± 0.39)
フェルラ酸	0.901 (7.77 ± 0.10)	1.83 (2.00 ± 0.01)	11.1 (22.2 ± 1.00)
ブドウ種子抽出物	2.09 (3.43 ± 0.11)	1.18 (3.12 ± 0.33)	61.6 (2.42 ± 0.12)
没食子酸	4.52 (1.55 ± 0.04)	3.96 (0.927 ± 0.055)	1046 (0.131 ± 0.028)
ミックストコフェロール	0.475 (14.7 ± 0.4)	0.431 (8.51 ± 0.08)	測定対象外
ヤマモモ抽出物	1.37 (5.11 ± 0.18)	1.49 (2.46 ± 0.06)	46.6 (3.72 ± 0.49)
ルチン (抽出物) A	0.979 (7.15 ± 0.21)	0.372 (9.88 ± 0.04)	24.0 (8.62 ± 0.31)
ルチン (抽出物) B	0.903 (7.75 ± 0.16)	0.338 (10.8 ± 0.2)	29.9 (6.67 ± 0.41)
ローズマリー抽出物 A	白濁のため測定不可	0.0395 (92.9 ± 4.0)	5.20 (56.5 ± 10.0)
ローズマリー抽出物 B	0.452 (15.5 ± 0.2)	0.247 (14.8 ± 0.1)	66.2 (3.43 ± 0.27)
トロロックス (µgml ⁻¹)	1.00 (7.00 ± 0.26)	1.00 (3.67 ± 0.25)	-----

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の成分と品質規格に関する研究

平成 18 年度分担研究報告書

酸化防止剤等の品質評価法に関する研究

-天然酸化防止剤 γ -オリザノールの定量および有効性の評価法に関する研究-

分担研究者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官

研究要旨

γ -オリザノールの定量法と抗酸化活性について検討した。本品の含量について HPLC 法および吸光度法で検討したところ、求められた定量値は、吸光度法>真値>HPLC 法であると考えられ、いずれかを規格試験法として採用する場合には、このことを考慮して限度値を設定する必要があると思われた。また、DPPH 法を用いて γ -オリザノールの抗酸化活性を評価したところ、フェルラ酸エステル類がほぼ等しい活性を持つことが確認され、活性値から含量を逆算可能であることが示唆された。したがって、本品目について、含量値以外にも「抗酸化価」という限度基準が新たに設定可能であると考えられた。

A. 研究目的

食品添加物の定量分析には、クロマトグラフィーを利用する方法、化学的な反応を利用する方法（滴定法等）、化合物固有の吸光度を利用した方法（吸光度法）等が主に利用されている。しかしながら、分析対象とする食品添加物によっては、正確な定量値を求めることが困難な場合がある。特に分析対象とする品目が複雑な混合物である場合、上記のいずれの方法によっても真の定量値を求めることは困難である。故に、天然由来の天然添加物（既存添加物）は、多くの品目が複雑な混合物であり、正確な含量を求めることのできる定量法を設定することが不可能である場合も多い。実際に、天然色素類では、含有される各色素成分の含量を求めることが困難であるため、食品添加物公定書には、各色素成分の含量を規定せず、「色価」という色の強度値を限度値として食品添加物公定書に用いている。したがって、天然色素以外の定量分析が困難な天然添加物についても、「色価」に相当するようなある一定の規制値を付加することが可能な評価法あるいは試験法を開発することが、将来、これらの公定法設定のために必要と考えられる。

天然酸化防止剤 γ -オリザノールは、「米ぬか又は胚芽油から得られた、ステロールとフェルラ酸及びトリテルペンアルコールとフェルラ酸のエステルを主成分とするものである。」と既存添加物名簿に定義されている。また、その基原・製法・本質は、「イネ科イネ(*Oryza sativa* LINNE)の種子より得られる米ぬか又は胚芽油より、室温時含水エタノール及びn-ヘキサン又はアセトンで分配した後、含水エタノール画分から得られたものである。主成分はステロールとフェルラ酸及びトリテルペンアルコールとフェルラ酸のエステルである。」と既存添加物名簿収載品目リスト注解書に記載されている。

本品は主に油脂の酸化防止剤として用いられ、その酸化防止能はフェルラ酸のp-OH基によるものとされている。しかし、本品の定量法については、十分に検討されておらず、公的な方法が提出されていない。これは、本品が定義に記載の通り、Fig. 1に示すステロールとフェルラ酸及びトリテルペンアルコールとフェルラ酸のエステル類を主構成成分とする混合物であるため、正確に含量を求めることのできる定量法を設定することが困難であることに起因する。

前年度は、天然酸化防止剤の簡便且つ迅速な評価法を検討したが、本年度は、天然添加物 γ -オリザノールの定量法を検討すると共に抗酸化活性を評価しその定量性について検討した。

B. 研究方法

1) 試料

天然酸化防止剤 γ -オリザノール(γ -oryzanol)は、日本添加物協会を通じて得た1製品(Lot. No. F03633)を用いた。なお、製品の付帯情報として、定量値 98.1%と記載されていたがその定量法は不明であった。シクロアルテニルフェルレート(cycloartenyl *trans*-ferulate, (CF))標準品は、和光純薬工業(株)より購入したものをを用いた。

2) HPLC法

試料約10 mgを精密に量り、EtOH:Acetone (1/1)を加えて10 mLとした。CFを用いて検量線($R^2 = 1$)を作成し、 γ -オリザノール中のフェルラ酸エステル類をCFとして求めた。

HPLC条件：column, XBridge™ C18 (4.6x150 mm, 5 μ m); column temp., 40°C.; solvent, CH₃CN/MeOH (9/1):H₂O=1:1(0 min) - 1:0 (15-40 min); rate, 1.0 mL/min; inj., 10 μ L, auto-sampler temp., 25°C; detect, UV320 nm.

3) 吸光度法

乾燥した試料約0.05 gを精密に量り、n-ヘプタン70 mLを加え、70~80°Cに加温して溶解した。常温まで冷却後、n-ヘプタンを加えて100 mLとした溶液について315 nm域の吸収極大の波長における吸光度Aを測定し、式(1)により γ -オリザノールの含量を求めた。なお、含量計算に用いた $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ は、「韓国FDA規格」および「国産農水産物利用食品新素材利用マニュアルNo.2 (農林水産省総合食料局委託事業, 社団法人菓子総合技術センター)」に記載されている値、またはCFより求めた値を用いた。

$$\text{content}(\%) = \frac{(A/E_{1\text{cm}}^{1\%}) \times 50000}{W} \times 100 \quad (1)$$

W = 試料の採取量(mg)

4) DPPH法

各試料(γ -オリザノール(食品添加物), CF, *trans*-フェルラ酸(東京化成工業(株)製試薬), *trans*-フェルラ酸エチル(合成品))をEtOHに溶解し、必要に応じて希釈したものを試料溶液とした後、24穴マクロプレートにTable 1に示すように分注した。0.2 mM DPPH溶液および100 mM TrisHCl (pH 7.4)を加えて10秒間攪拌し、暗所で30分静置後の各穴の517 nmの吸光度Aを測定し、式(2)によりフリーラジカル消去活性(%)を求めた。なお、DPPH溶液は、DPPH(ナカライ製)を試験直前にEtOHに溶解したものをを用いた。

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank2}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank1}})}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank2}}} \times 100 \quad (2)$$

C. 結果及び考察

1) 定量法に関する問題

Fig. 1 に天然酸化防止剤 γ -オリザノールに含まれる主な化合物を示したが、これら以外にも γ -オリザノールの微量成分として多数のフェルラ酸エステルが報告されている。実際に、今回入手した試料をHPLCに付したところ、検出波長 320 nm において、Fig. 2 の様にピークが観察され、ESI-MS および文献値との比較から、ピーク 1 を cycloartenyl *trans*-ferulate, ピーク 2 を 24-methylenecycloartenyl *trans*-ferulate, ピーク 3 を campesteryl *trans*-ferulate, ピーク 4 を sitosteryl *trans*-ferulate, ピーク 5 を campestanlyl *trans*-ferulate, ピーク 6 を sitostanyl *trans*-ferulate と同定した。その他、ピーク 1~6 に対して非常に小さいが保持時間 16 分から 34 分の間に多数のピークが観察された。これらは、他のステロール類またはトリテルペンアルコール類とフェルラ酸のエステル類、または *cis*-フェルラ酸エステル類であると推定されたが、詳細は不明で

あった。

シクロアルテニルフェルレート(CF)標準品を用いて検量線($R^2=1$)を作成し、 γ -オリザノール製品中のフェルラ酸エステル類の含量を CF として求めた。ピーク 1~6 を合計した場合、93.1% となり、保持時間 16 分から 34 分までのベースラインより上の全てのピークを合計した場合、99.2% となった。よって、本製品は定量値 98.1% と記載されていたが、これと一致せず、定量法の違いによるものと考えられた。以上の結果、HPLC 法では、微量成分と考えられるピークをどのように扱うかによって大きく定量値に誤差を与えることが明らかとなった。

一方、 γ -オリザノールの吸光度法による定量法は、韓国 FDA で採用されており、また、我が国においては、農林水産省総合食料局委託事業によってなされた、「国産農水産物利用食品新素材利用マニュアル No2」に報告されている。ただし、両者に採用されている吸光度法に用いられている常用吸光係数($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)は前者が 353、後者が 359 と異なっている。また、シクロアルテニルフェルレート(CF)標準品より $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ を求めたところ、361 となった。本製品の含量を求めた結果を Table 2 に示したが、HPLC 法に比べて大きく見積もる結果となった。したがって、用いられた $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ が定量値に大きく影響することが確認された。

2) 抗酸化活性の評価と定量性

γ -オリザノールは、主に油脂の酸化防止剤として用いられ、その抗酸化活性は、分子中のフェルラ酸部によるものでアグリコン部は関係しないと考えられている。そこで、 γ -オリザノール、シクロアルテニルフェルレート(CF)、フェルラ酸、フェルラ酸エチルの抗酸化活性を DPPH 法を用いて評価した。なお、フェルラ酸エチルは市販されていなかったため、常法によりフェルラ酸とエタノールから脱水縮合反応より合成したものをを用いた。Fig. 3 に濃度と活性の関係を示したが、約 1000 μM 以下で濃度と活

性の間に比例関係が成立することが確認された。 γ -オリザノール製品および各化合物の低濃度での活性を比較すると、フェルラ酸を除くものは、殆ど同じような強度の活性が観察され、また、濃度と活性の間に比例関係が成立した。したがって、フェルラ酸エステルでは、エステル部の構造にかかわらず活性がほぼ等しいと考えられた。また、 γ -オリザノールとシクロアルテニルフェルレート(CF)の活性がほぼ等しいことから、シクロアルテニルフェルレート(CF)の活性を基準として、 γ -オリザノールの活性から含量が算出可能と考えられた。

D. 結論

γ -オリザノールの定量法と抗酸化活性について検討した。HPLC 法では、微量成分のピークをどのように扱うかによって定量値が大きく異なることがわかった。吸光度法では常用吸光係数の値が定量値に影響を与えることが確認された。いずれの場合も真値を求めるには不十分な方法であるが、今回求められた定量値は、吸光度法 > 真値 > HPLC 法と考えられ、将来、いずれかを規格試験法として採用する場合には、このことを考慮して限度値を設定する必要があると思われる。また、 γ -オリザノールの抗酸化活性を DPPH 法を用いて評価したところ、フェルラ酸エステルがほぼ等しい活性を持つことが確認され、活性値から含量を算出可能であることが示唆された。したがって、本品目について、「抗酸化価」という規格基準が設定可能であると考えられ、今後、抗酸化活性の評価法を更に検討する予定である。また、従来法では定量が困難であると思われる他の天然酸化防止剤についても応用を試みる予定である。

E. 研究発表

なし。

Table 1 DPPH 法における各穴の内容量

	sample	control	blank1	blank2
試料 (solv. H ₂ O or EtOH)	200 μ L		200 μ L	
H ₂ O or EtOH		200 μ L		200 μ L
100 mM Tris HCl (pH7.4)	800 μ L	800 μ L	800 μ L	800 μ L
0.2 mM DPPH in EtOH	1000 μ L	1000 μ L		
EtOH			1000 μ L	1000 μ L

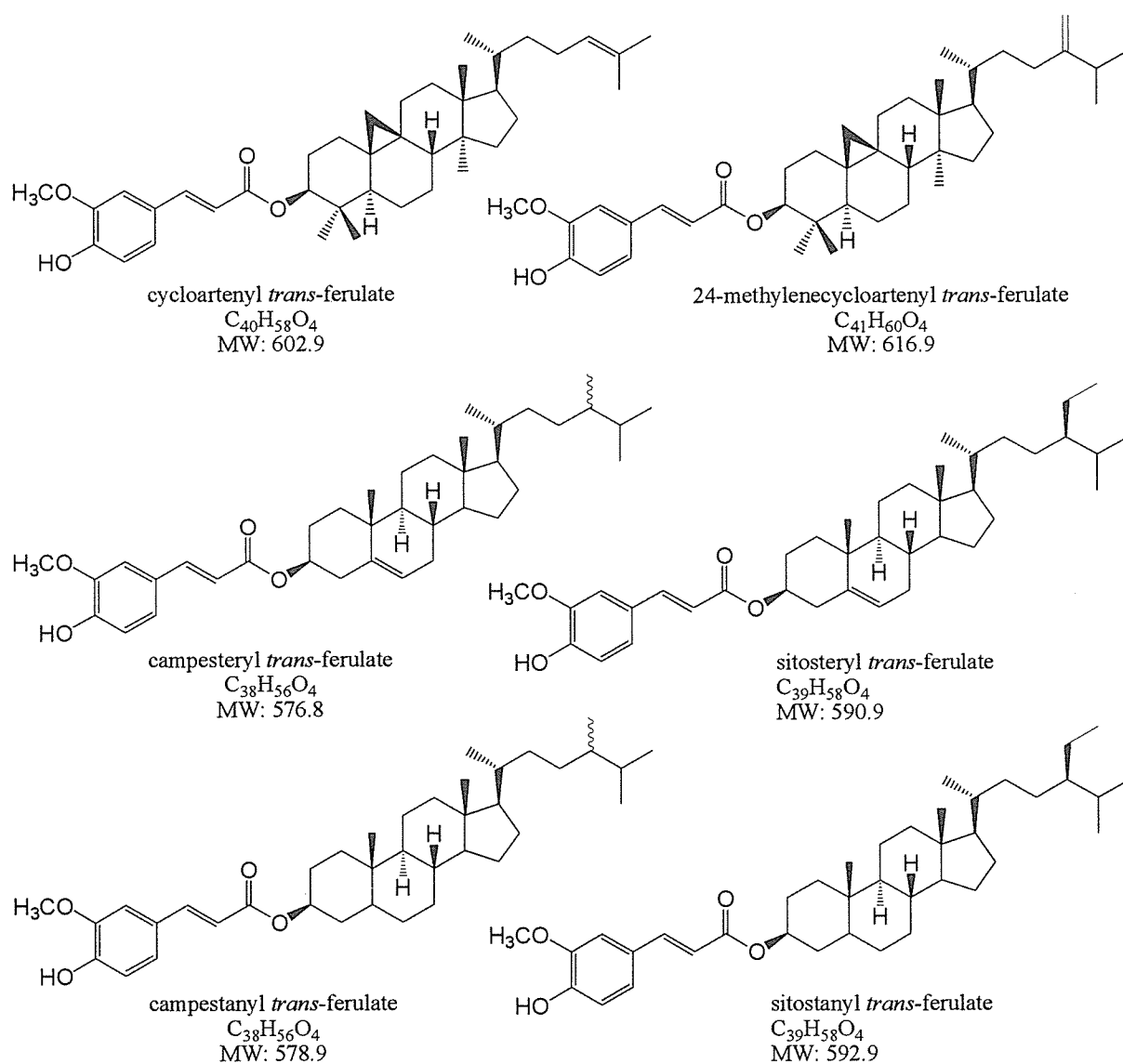


Fig. 1 γ -oryzanol 中に含まれる主な化合物

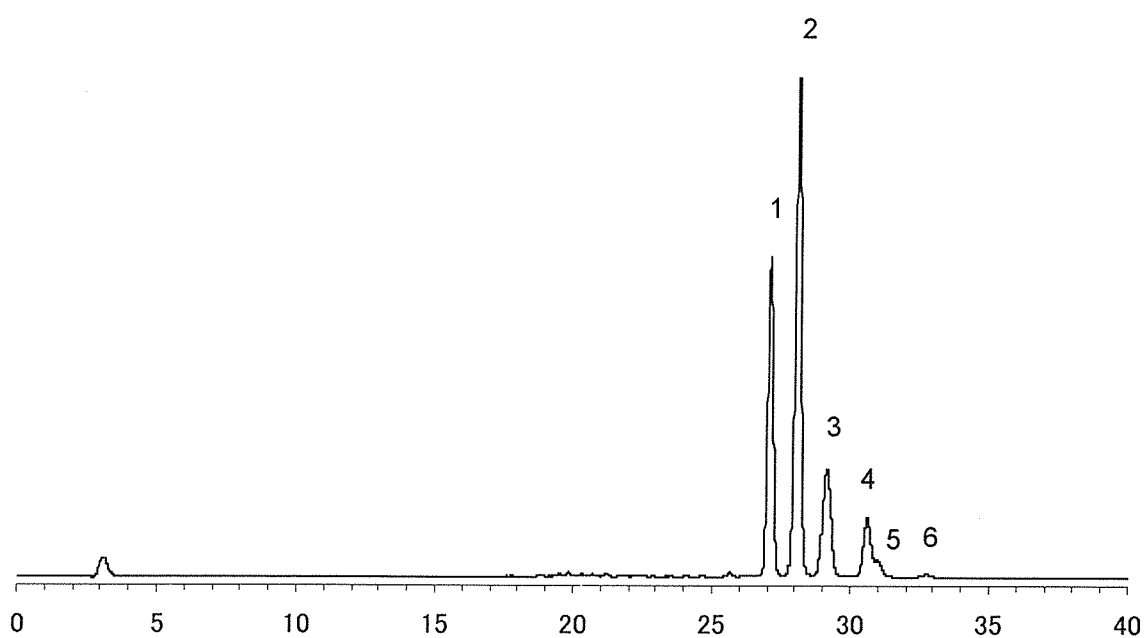


Fig. 2 HPLC profile of γ -oryzanol

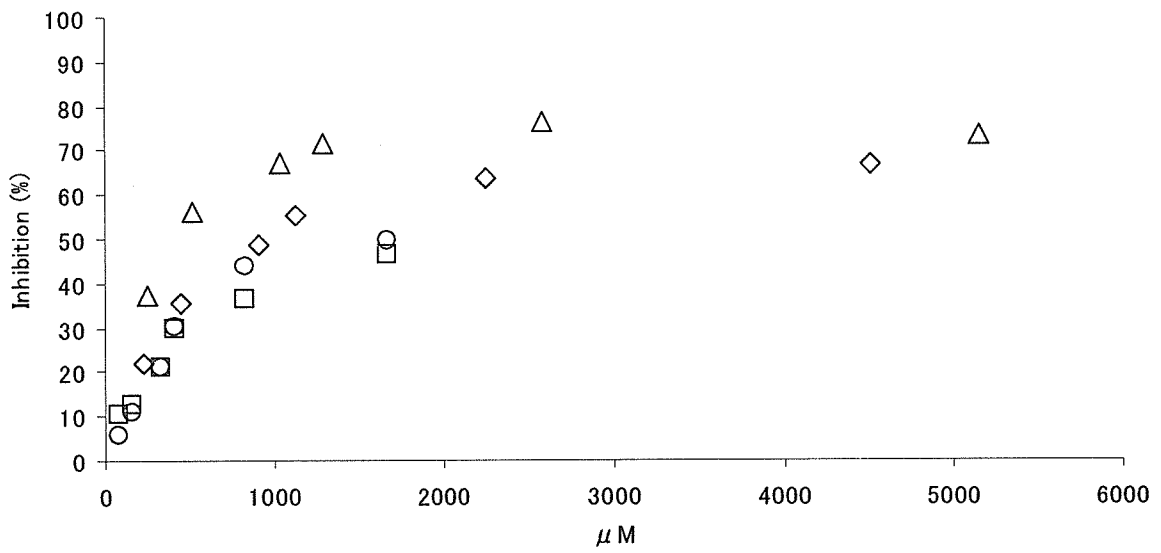
1 = cycloartenyl *trans*-ferulate, 2 = 24-methylenecycloartenyl *trans*-ferulate, 3 = campesteryl *trans*-ferulate, 4 = sitosteryl *trans*-ferulate, 5 = campestanyl *trans*-ferulate, 6 = sitostanyl *trans*-ferulate

Table 2 γ -Oryzanol 中のフェルラ酸エステルの定量(吸光度法)

測定法	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	含量(%) (av. n=3)	sd
KFDA 規格 (第2版自主規格)	353	104.2	1.1
食品素材マニュアル	359	102.5	1.1
cycloartenyl ferulate として計算	361*	101.9	1.1

*cycloartenyl ferulate (std (Wako))を用いて $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ を求めた.

a)



b)

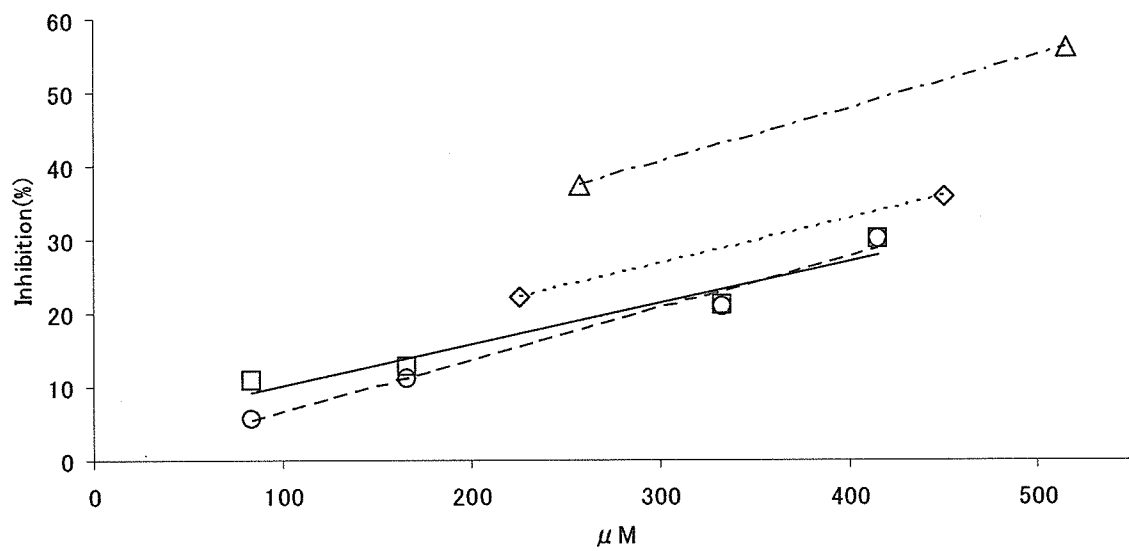


Fig. 3 各試料の濃度と活性の関係

△: ferulic acid, ◇: ethyl ferulate, □: cycloartenyl ferulate (CF), ○: γ-oryzanol.

2. 酸化防止剤の成分・品質に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

平成 18 年度分担研究報告書

ブドウ種子抽出物の成分と分析法に関する研究

分担研究者 永津 明人 金城学院大学薬学部教授

研究要旨 昨年度に引き続き、酸化防止剤として用いられている食品添加物「ブドウ種子抽出物」の規格作成において検討が必要と考えられる点のうち、カテキン類の HPLC 定量の条件の改善と昨年度の研究で標準品と保持時間の一致しなかったピークの化合物の同定、異なるロットの試料でのクロマトグラムの相違について検討した。Cosmosil Cholesterol でカラム長を延長することでバックグラウンドの化合物とカテキン類との分離においてさらに良好な結果が得られた。この分析条件で標準品と保持時間の一致しなかったピークのうち 2 つは procyanidin B1,(-)-epicatechin であることが確認された。また、異なる 4 ロットの試料でクロマトグラムを比較し、ロット間で含有成分に大きな相違がみられないことがわかった。

A. 研究目的

「ブドウ種子抽出物」はブドウ科ブドウの種子を熱水、温エタノール又は温アセトンを用いて抽出したもので、プロアントシアニジン（カテキン類ダイマー～ポリマー）を主成分とし、酸化防止剤として用いられる。

業界自主規格では総フラバノール量から定量可能なカテキン類量を差し引いて総プロアントシアニジン量としている。昨年度、定量可能な部分の改良ということで、カテキン類の同定・定量ための HPLC 条件の改善を目的として研究を行なった結果、Cosmosil Cholesterol を用いた HPLC 条件で、以前課題となっていた各種カテキン類とベースラインの膨らみとして観測されるバックグラウンドの化合物との分離に目処をつけた。またその際、定量に利用可能な大きさのピークで標準品から同定できなかったピークもいくつか存在していることを確認した。

そこで今年度は、定量可能なカテキン類定量た

めの HPLC 条件の改善、標準品から同定できなかったピークの化合物の同定、さらに昨年度は 1 ロットの試料のみでの検討だったので、複数ロットでのクロマトグラムの比較を行なった。

B. 研究方法

昨年度の Cosmosil Cholesterol 4.6 mm i.d. x 150 mm カラムでの検討結果をふまえ、カラム長を 250 mm にした場合で HPLC 条件を検討した。ここで検討した条件で、複数ロットのクロマトグラムの比較を行なった。また、未同定のピークに関しては、単離構造決定を基本に確認作業を行なった。

C. 研究結果

クロマト条件の検討： Cosmosil Cholesterol 4.6 mm i.d. x 250 mm カラムを用いて濃度勾配や添加する酸の種類なども検討した。溶出溶媒に添加する酸について、酢酸、ギ酸での検討も行なったが十分にシャープなピークを得ることができず、こ

れまで通り 10 mM リン酸溶液を用いることにした。MeOH-水の混合溶媒のグラジエント条件も検討した結果、10 mM リン酸 MeOH 溶液 - 10 mM リン酸水溶液 = 10:90 から 40 分で 40:60, 60 分で 100:0 という条件で Fig. 1A に示すようなクロマトグラムとなり、当初 ODS での条件に比べカテキン類のピークとバックグラウンドを完全に近く分離できることが明らかとなった。

各ピークの化合物の同定： まず、5 種のカテキン類((+)-catechin, (+)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate) 標準品と、カテキン 2 量体として昨年度使用した procyanidin B2 とともに市販の procyanidin B1 も加え、保持時間の確認を行なった。その結果、23.8 分付近のピークが procyanidin B1, 27.2 分付近のピークが(+)-catechin, 31.6 分付近のピークが procyanidin B2, 48.3 分付近の小さなピークが(-)-epicatechin gallate であることがわかった。(-)-epigallocatechin, (+)-epicatechin のピークは試料中には確認できなかった。また、昨年度保持時間が一致すると判断できるピークがあった(-)-epigallocatechin gallate は対応するピークの保持時間がずれてしまい、それと確認できるピークは存在しなくなった。

一方、昨年度未同定だったピークのうち保持時間の短いピークの化合物は procyanidin B1 と判明した。そこで、未同定だったピークのうち大きなピークから単離・同定することにし、epicatechin と保持時間が極めて近い 36.8 分のピークと 41.2 分のピークについては、昨年度と同じロットの「ブドウ種子抽出物」を用いて単離を行なった。

「ブドウ種子抽出物」110 mg を Cosmosil Chorester 20 mm i.d. x (50 mm ガードカラム + 250 mm カラム)を用い、MeOH-H₂O-HCO₂H = 40:60:1 で分取を行ない、Fig. 2 のようなクロマトグ

ラムを与えた。このうち Fr.1, 2 と示したピークに相当する化合物をそれぞれ 4 mg, 6 mg 分取した。分析条件の HPLC で確認したところ、Fr.1 が 43.2 分のピーク、Fr.2 が 36.8 分の epicatechin に隣接するピークであることがわかった。(Fig.3)

Fr.1 は ESI-FT-ICR-MS において m/z: 279.0386 のピークが観測された。NMR 測定の結果、分解能が非常に悪く、解離状態が一定でない化合物であることが推定された。現在、引き続き良好なスペクトルが得られる条件を探している。

Fr.2 は ESI-FT-ICR-MS において 291.0861 ([M+H]⁺, calcd. for C₁₅H₁₅O₆, 291.0869, 0.8 mmu error) で catechin, epicatechin と同じ分子式であることがわかった。¹H-NMR スペクトルでは、3 置換ベンゼン、お互いに meta 位にあると推定される 1 組の芳香族プロトン、CH₂-CH-CH の脂肪族プロトンが観測され、このうち 2 コのメチンプロトンは酸素官能基に隣接する炭素に結合していると推定できた。¹³C-NMR スペクトルでは、sp²炭素 12 コのうち酸素官能基に隣接すると考えられる sp²炭素 5 コ、その他の 4 級炭素は 2 コであった。HMQC, HMBC の各測定で C-H の直接、遠隔相関も確認したところ(Table 1), catechin または epicatechin の平面構造が推定できた。¹H-NMR スペクトルにおけるメチン水素のいずれも小さい結合定数であると推定される br-s であることから 2,3 位-cis であることが推定された。この構造は epicatechin であり、標準品の NMR スペクトルを測定・比較したところ全く一致した。(+)Epicatechin と保持時間が異なるこの化合物も epicatechin と同定せざるを得なくなった。

分析に用いている Cosmosil Chorester でこれまでに鏡像体を分離した例は報告されていないが、シリカゲルの修飾に用いられているコレステロールは光学活性体なので、光学異性体を認識する

ことは理論的には可能である。そこで単離した化合物と使用した(+)-epicatechin 標準品の旋光度を比較した。その結果、単離した化合物の比旋光度 $[\alpha]_D^{14}$ が-30 ($c = 0.30$, MeOH) だったのに対して、標準品は+61 ($c = 0.16$, MeOH) で、お互いに符号が逆であった。よって、単離した Fr.2 の化合物は (-)-epicatechin であると同定した。同時に、このカラムで光学活性体の分離が可能であることがわかった。

クロマトグラムのロット間での相違の確認： 4 ロットの「ブドウ種子抽出物」試料について、今回確立した分析条件でのクロマトグラムの比較を行なった。(Fig. 1) その結果、4 ロットとも非常によく似たクロマトグラムを与えた。Fig. 1B のロットにのみ 34.5 分に比較的目標ピークが観測されていたが、少なくともカテキン類が分離できる保持時間での化合物の組成は、今回の4ロットでは大きな相違はなかった。

D. 考察

HPLC 条件の改善の結果、さらにカテキン類とバックグラウンドに存在する化合物群との分離ができ、カテキン類の定量には支障の無い状況になったと考えられる。昨年度未同定ピークの化合物の構造決定では、Fr. 2 に含有される化合物（分析条件で保持時間 36.8 分のピーク）を(-)-epicatechin と同定した。旋光度の値が文献値や標準品の(+)体より小さかったが、これは夾雑物まだあり純度が低いためではないかと考えられる。いずれにしても標準品と符号が逆であることから cholest のカラムで epicatechin の光学活性体が認識されることを見いだした。他のカテキン類も光学活性が認識されている可能性があり、確認が必要である。また、今回の単離したものの同定に至らなかった Fr. 1 と、38.5 分付近のピークについて、単離構造

決定を行なう予定である。

4 ロット間でのクロマトグラムの比較では、各サンプルほぼ同じカテキン類の組成を示した。Fig. 1B のロットのみ、34.5 分付近にピークが観測されこれも標準品にない化合物なので、単離などを行なって同定する必要があると考えられる。

E. 結論

* 「ブドウ種子抽出物」のカテキン類の HPLC 分析条件の検討として、カラムとして Cosmosil Cholesterol を用いた分析条件の改善を検討し、長さ 250 mm カラム、展開溶媒に 10 mM リン酸 MeOH 溶液—10 mM リン酸水溶液を用いた分析条件で、ODS カラムを用いたときにベースラインの膨らみとして観測されていたバックグラウンドの化合物とカテキン類のピークとをほぼ完全に分離することができた。

* 昨年度未同定だったクロマトグラム上のピークのうち 1 つは procyanidin B1、もう 1 つの保持時間 36.8 分のピークは単離構造決定の結果、(-)-epicatechin であると同定した。

* 今回は試験した 4 ロット間で、クロマトグラムの相違はほとんどなかった。

* Cosmosil Cholesterol カラムは epicatechin の光学活性体を認識が可能であるとわかった。このカラムが光学活性体を認識した初の例と考えられる。他のカテキン類の光学活性体も認識が可能かの確認が必要である。

F. 研究発表

現在のところなし

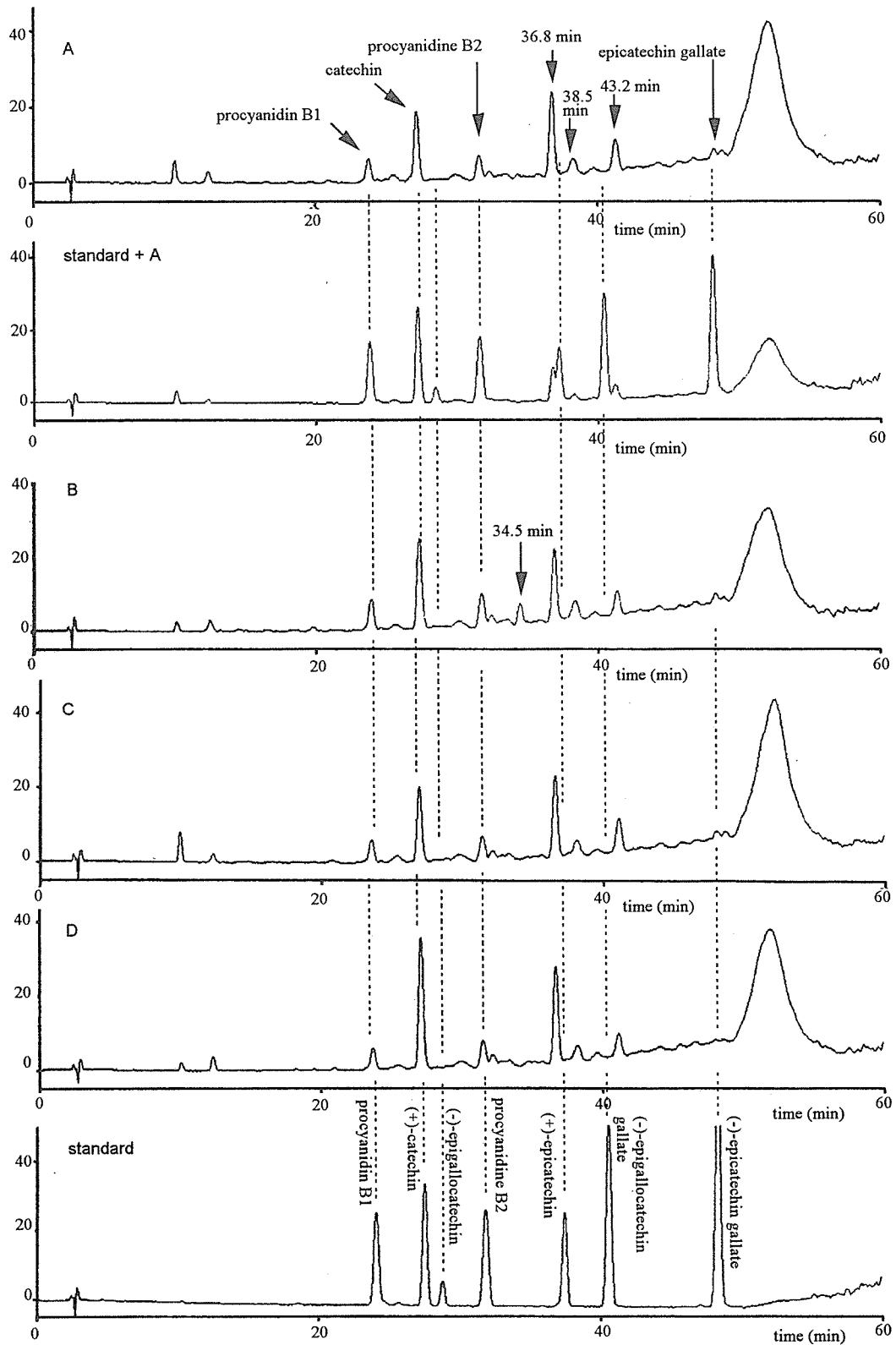


Fig. 1 ブドウ種子抽出物各ロット(A-D), カテキン類標準品(standard)のクロマトグラム
 Cosmosil Chorester. 4.6 mm i.d. x 250 mm; 溶媒:10 mM リン酸 MeOH 溶液—10 mM リン酸水溶液 =10 : 90
 →40 : 60 (40 min)→100 : 0 (60 min), 流速 1 mL/min, 検出 UV 280 nm。
 A-D : ブドウ種子抽出物 1.0 mg/ml を 20 μ l, standard: カテキン類標準品 0.04 mg/ml を 20 μ l, それぞ
 れインジェクト。カテキン標準品は, (+)-catechin, (+)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate,
 (-)-epigallocatechin gallate, procyanidin B1, procyanidin B2 の 7 種類。standard + A:カテキン類標準品 0.04
 mg/ml,ブドウ種子抽出物 A 1.0 mg/ml を各 10 μ l をインジェクト。

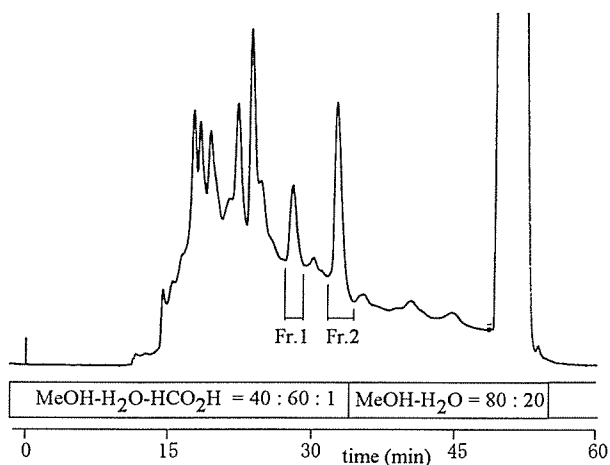


Fig. 2 ブドウ種子抽出物ロット A の分取クロマトグラム

Cosmosil Cholesterol. 20 mm i.d. x (50 + 250) mm; 溶媒: MeOH-水-ギ酸 = 40 : 60 : 1 → MeOH-水 80 : 20, 流速 6 mL/min. 検出 UV 280 nm. ブドウ種子抽出物 20 mg/ml を 500 μ l インジェクト, Fr. 1, 2 で示した部分をそれぞれ分取。

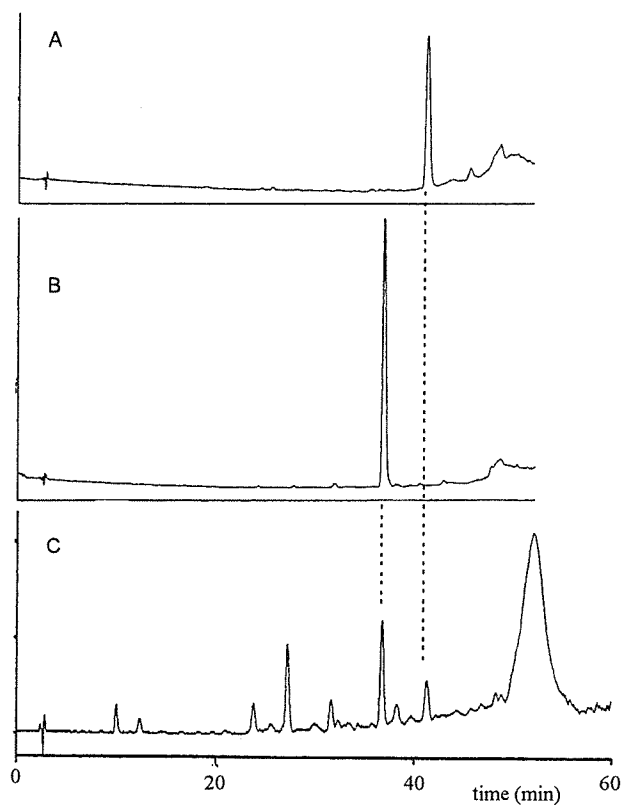
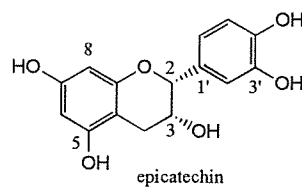


Fig. 3 分取した Fr.1 (A), Fr. 2 (B) とブドウ種子抽出物 (C) のクロマトグラム

条件は Fig. 1 と同じ。

Table 1 Fr.2 の NMR スペクトル (in CD₃OD)



	¹³ C \square_C ppm 125 MHz	¹ H \square_H ppm 500 MHz	HMBC (H→C)
2	79.5	4.82 br-s	
3	67.5	4.17 br-s	
4	29.3	2.74 dd $J = 5, 16$ Hz 2.86 dd $J = 1, 16$ Hz	2, 3, 10
5	157.4 ^a		
6	95.4 ^b	5.86 d $J = 2$ Hz	5, 7, 8, 10
7	157.7 ^a		
8	95.9 ^b	5.90 d $J = 2$ Hz	6, 7, 9, 10
9	157.8 ^a		
10	100.5		
1'	132.3		
2'	119.4	6.95 dd $J = 1$ Hz	2, 3', 4', 6'
3'	145.8 ^c		
4'	145.9 ^c		
5'	115.3	6.75 d $J = 8$ Hz	1', 3', 4'
6'	115.9	6.80 dd $J = 1, 8$ Hz	2, 2', 4'

^{a,b,c} 同一カラム内で入れ替わる可能性がある。

カンゾウ油性抽出物の成分分析

分担研究者 尹 永淑 東京薬科大学生命科学部 助手

研究要旨

カンゾウ油性抽出物の含有成分を明らかにするため、カンゾウ油性抽出物を種々のカラムクロマトグラフィーを行った結果、主成分としてグラブリジンが単離された。今回分析したカンゾウ油性抽出物の基原植物はヨウカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* LINNE)であると判断した。

A. 研究目的

カンゾウ油性抽出物は、既存添加物名簿に酸化防止剤として、「ラウルカンゾウ、チョウカカンゾウ又はヨウカカンゾウの根又は根茎から得られた、フラボノイドを主成分とするものをいう。」と定義されている。また、既存添加物名簿収載品目リスト注解書には、カンゾウ油性抽出物の基原・製法・本質として「マメ科ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* FISCHER.)、マメ科チョウカンゾウ (*Glycyrrhiza inflata* BATALIN) 又はマメ科ヨウカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* LINNE) の根又は根茎を水で洗浄した残渣より、室温～温時エタノール、アセトン又はヘキサンで抽出して得られたものである。主成分はフラボノイドである。」と記載されている。よって、カンゾウ油性抽出物の基原植物として3種が当てられており、基原植物として何を用了かによって含有成分が異なり抗酸化性もことなると考えられる。本研究では、市販のカンゾウ油性抽出物製品の含有成分の化学構造を明らかにし、食品添加物として化学的な安全性を確保することを目的とした。

B. 研究方法

1. カンゾウ油性抽出物の成分分析

日本食品添加物協会を通じて入手したカンゾウ油性抽出物1製品700 mLを水で懸濁し、ヘキサン、酢酸エチル、および*n*-ブタノールで順次分配を行った。抽出量が多かった酢酸エチル抽出物(84 g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(10.5 × 17 cm) (CHCl₃ : CH₃OH 溶媒系)に付し、6つの画分(Frs. A1～6)を得た。その内、Fr. A3(51.89 g)1gを取り、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : CH₃OH=0 : 1, 50 : 1, 20:1, 10:1, 9:1)に付し、5つのフラクションを得た(Frs. A3-1～5)。Fr. A3-3とFr. A3-4をODS-HPLC(80% CH₃CN)にて精製を行い、化合物1および2を単離した。またFr. A4(15.9 g)1.03 gを取り、LH-20沈殿物(3.01 g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(4.5 × 42 cm) (CHCl₃ : CH₃OH : 水=1 : 1 : 0.1 溶媒系)に付し、5つのフラクションを得た(Frs. A-4-1～5)。Fr. A-4-3をODS-HPLC(1% 酢酸を含む60% CH₃CN)により精製し、化合物3を得た。Fr. A-4-4およびFr. A-4-5をODS-HPLC(50% CH₃CN for Fr. A-4-4, 55% CH₃CN for Fr. A-4-5)により精製し、