

図1 DPPH法により求めた各種酸化防止剤のTEACの相関

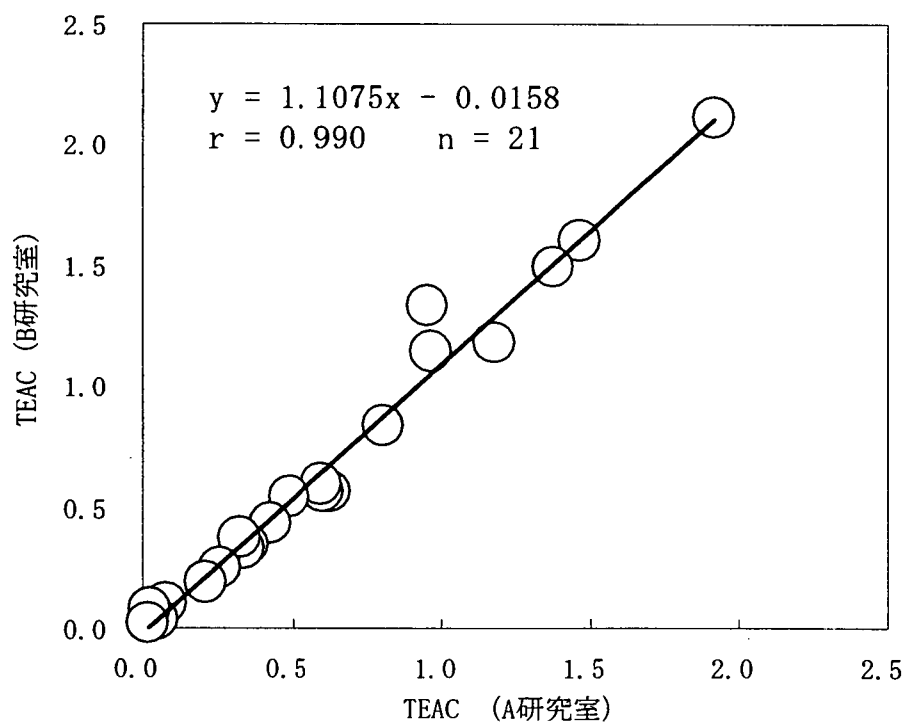


図2 ABTS法により求めた各種酸化防止剤のTEACの相関

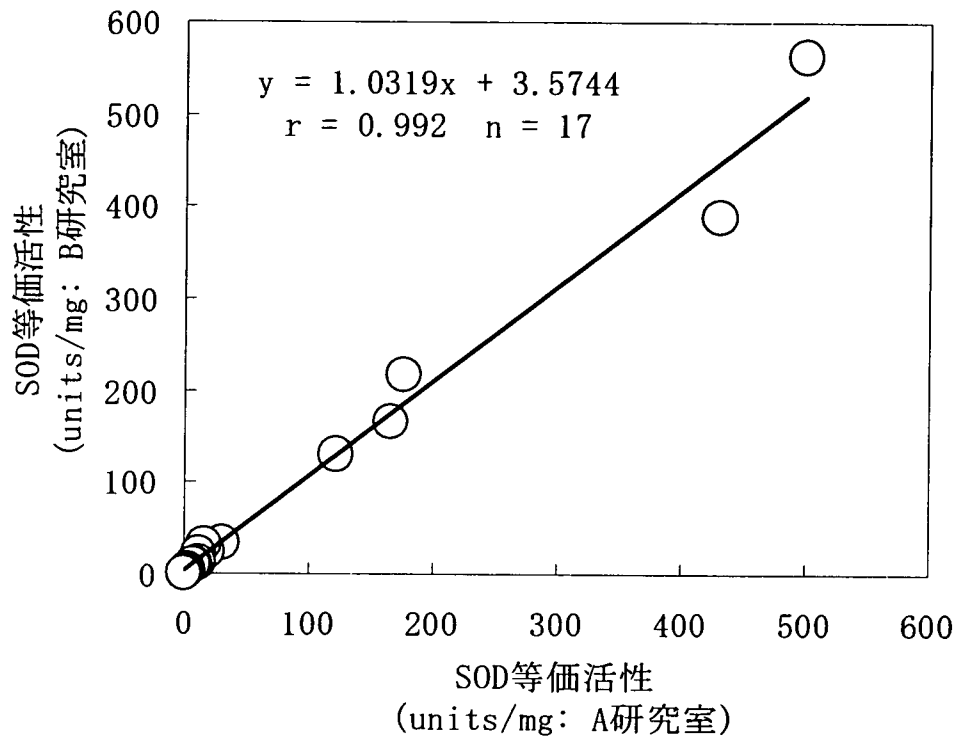


図3 WST-1法により求めた各種酸化防止剤のSOD等価活性の相関

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19年度分担研究報告書

天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究

分担研究者 松本 清 九州大学農学研究院 教授

協力研究者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

協力研究者 松藤 寛 日本大学生物資源学部 講師

研究要旨

「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中で単一の成分からなる添加物（カテキン、ケセルチン、セサモール、フェルラ酸、没食子酸、モリン、エラグ酸、*d*α-トコフェロール、*d*δ-トコフェロール）と、BHT 及び BHA を加えた11種について、それらの2成分混合系における抗酸化剤の効果（相乗効果、相加効果、相殺効果）を2つのレベル（IC₅₀の濃度、IC₂₅の濃度）で検討した。測定法は共同試験の結果、研究室間での測定値が最も安定していた DPPH ラジカル消去活性法を採用した。55 通り×2 レベルの組み合わせ試験の結果、18 種類の組み合わせで相加効果、36 種類の組み合わせで相乗効果が認められた。しかしながら、相乗効果の認められた組み合わせでも、その効果は弱く相加性を僅かに上回る程度であった。相殺効果が認められた組み合わせは1種類のみであったが、その効果も相加性を僅かに下回る程度であった。全体として、抗酸化剤の併用効果は相加的と考えられた。

A. 研究目的

食品への用途が認められている酸化防止剤の品質規格の設定を目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の検証と混合系での効果を検討した。平成18年度までの結果から、測定法として最も安定した結果を与える DPPH ラジカル消去活性法を採用した。今回の研究では、「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中で比較的抗酸化活性が高く、安定した抗酸化活性を示す単一化合物からなる添加物（カテキン、ケルセチン、セサモール、フェルラ酸、没食子酸、モリン、エラグ酸、*d*α-トコフェロール、*d*δ-トコフェロール）と合成抗酸化剤である BHT 及び BHA を加えた11種について、それらの2成

分混合系における抗酸化性の効果（相乗効果、相加効果、相殺効果）を2つの濃度レベル（IC₅₀の濃度、IC₂₅の濃度）で検討した。

B. 研究方法

(1) DPPH ラジカル消去活性測定

Choi らの方法を一部変更して行った¹⁾。試験管に試料溶液 200 μl, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 800 μl, 0.20 mM DPPH エタノール溶液 1 ml を添加し、10 秒間激しく攪拌した後、暗所で常温にて 30 分間静置した。30 分後、反応溶液の 517 nm における吸光度を測定した。試料溶液の代わりに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。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。

今回は試料の Trolox 等価活性 (TEAC) では評価せず直接測定系の阻害率で評価した。

(2) 50%阻害濃度における混合系評価

Table 1 に示す各単一化合物の IC₅₀ 値を参考に、終濃度がそれぞれ IC₅₀ 値の濃度になるよう 2 成分の混合系溶液を作製した。それらの試料を直接 DPPH ラジカル消去活性測定に供し、常法に従い阻害率を算出した。

(3) 25%阻害濃度における混合系評価

Table 1 に示す各単一化合物の IC₅₀ 値を参考に、50%阻害率を示す濃度の溶液を調製した (例えば、試料 A と試料 B)。それらを等量で混合したものを混合試料 (25%阻害濃度混合系試料 A+B) とした。混合試料の DPPH ラジカル消去活性 (I_M) は、常法に従い測定した。また、同時に、試料 A に等量のエタノールを加えたもの (A×2) 並びに試料 B に等量のエタノールを加えたもの (B×2) を調製し、これらの DPPH ラジカル消去活性も測定し、予測値を求めた。

すなわち、試料 A と B の混合試料の阻害率の予測値 (I_E) は以下の式で計算できると報告されている^{2, 3)}。

$$I_E = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B / 100) \dots\dots (1)$$

従って、この予測値 I_E と実測値 I_M とを比較し、混合系の阻害率に及ぼす影響を評価した。

評価基準は対応のある t 検定により、予測値 (阻害率%) と実測値 (阻害率%) の平均値の差の検定を行い、危険率 5% で差の有無を判定した。表示は(実測値 I_M)/(予測値 I_E)の比で表した。従って、比の値が 1 以上で有意差ありの場

合：相乗効果、1 以下で有意差ありの場合：相殺効果、それ以外の場合：相加効果と判定した。

C. 研究結果

(1) 50%阻害濃度における混合系評価

本実験系では、各抗酸化剤の終濃度を IC₅₀ に設定しているため、予測阻害率 (I_E) としては 75% を想定している。Table 1 に示すように、各混合系の組み合わせとも 75% を中心に、64.2% (δ-トコフェロールと BHA) から 78.8% (α-トコフェロールと BHT) の範囲にあり、相加効果から大きく外れるものではなかった。

(2) 25%阻害濃度における混合系評価

25%阻害濃度での混合系評価を行うため、各単一化合物の阻害率と混合試料の阻害率を測定し、予測阻害率 (I_E) と実測阻害率 (I_M) を求め、統計的処理による解析を行った。Table 2 に示すように、予測阻害率 (I_E) と実測阻害率 (I_M) は比較的一致している。Table 2 の値を t 検定処理し、各組み合わせにおける平均値の差の有意性を判定し、(I_M)/(I_E)比で表したものが Table 3 である。Table 3 の中で太字表示したものは比の値が 1 以上で有意差ありの組み合わせ (相乗効果) であり、斜体表示のものは比の値が 1 以下で有意差ありの組み合わせ (相殺効果) のもの、標準字体表示のものは有意差なし (相加効果) と判定されたものである。Table 3 によると、55 通りの組み合わせのうち、18 種類の組み合わせで相加効果、36 種類の組み合わせで相乗効果が認められた。しかしながら、相乗効果の認められた組み合わせでも、その効果は弱く相加性を僅かに上回る程度であった。相殺効果が認められた組み合わせは 1 種類のみであったが、その効果も相加性を僅かに下回る程度であった。

D. 考察

11種の抗酸化剤について、それらの2成分混合系における抗酸化性の効果（相乗効果、相加効果、相殺効果）を2つのレベル（IC₅₀の濃度、IC₂₅の濃度）で検討した。IC₅₀値の濃度での系では混合試料のみの阻害率測定しか行っていないので、予測阻害率（I_E）と実測阻害率（I_M）の平均値の差の検定はできなかったが実測阻害率は64.2%~78.8%の範囲にあり予測阻害率75%から大きく外れるものではなかった。25%阻害率での混合系では、統計上36種類の組み合わせで相乗効果と判定される結果となったが、それらの(I_M)/(I_E)値は1から大きく外れるものではなく、相乗効果としては小さく相加効果を若干上回る程度と思われた。混合系の評価では、組み合わせの濃度レベルでも影響されることが報告されており⁴⁾、今回、2濃度レベルで調査した結果からも、その傾向はみられた。

混合効果の判定に、式(1)を用いたが、他にも解析方法が報告されており⁴⁾、複数の解析による判断が必要と考えられる。しかしながら、今回は実験設定を上記のみに限ったため、他の解析法を行うには至らなかった。

E. 結論

11種の抗酸化剤について、55通り×2レベルの組み合わせ試験の結果、18種類の組み合わせで相加効果、36種類の組み合わせで相乗効果が認められた。しかしながら、相乗効果の認められた組み合わせでも、その効果は弱く相加性を僅かに上回る程度であった。相殺効果が認められた組み合わせは1種類のみであったが、その効果も相加性を僅かに下回る程度であった。全体として、抗酸化剤の併用効果は相加的と考えられた。

F. 研究発表

(1) 論文発表

島村智子、松浦理太郎、徳田貴志、杉本直樹、山崎壮、松藤寛、松井利郎、松本清、受田浩之：酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験、日本食品科学工学会誌、54(11)、482-487(2007)

(2) 学会発表

松浦理太郎、徳田貴志、杉本直樹、山崎壮、松藤寛、松井利郎、松本清、島村智子、受田浩之：酸化防止剤の力価に対する各種抗酸化活性測定法の適用について、日本食品科学工学会第54回大会、2007年9.6-7(福岡)

松藤 寛、千野 誠、受田浩之、松本 清、山形一雄：天然酸化防止剤ローズマリー抽出物中の活性成分について 第14回日本食品化学学会学術大会、2008年5月、西宮[発表予定]

島村智子、平山大剛、杉本直樹、山崎壮、松井利郎、松本清、受田浩之：酸化防止剤の力価評価に対する各種抗酸化活性評価法の適用性—天然物由来酸化防止剤について—、日本食品科学工学会第55回大会、2008年9月、京都[発表予定]

参考文献

- 1) H-S. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4156-4161 (2000).
- 2) M. Doret et al., *Int. J. Obster. and Gynaec.*, **110**, 731-734(2003).
- 3) J. Shi et al., *J. Food Comp. Anal.*, **20**, 603-608 (2007).
- 4) S. Savelv et al., *Phar. Biochem. Behav.*, **75**, 661-668(2003).

Table 1. 50%阻害濃度での混合系における阻害率

	IC50(μg/ml)		BHA		CT		QC		SM		FA		GA		MO		EA		aTOC		dTOC	
	value	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.
BHT	73.2	0.7	73.4	0.4	75.9	0.3	74.1	1.6	70.3	0.2	77.6	0.4	73.9	0.9	76.5	1.2	76.9	0.6	78.8	0.2	72.3	1.4
BHA	38.9	1.3	-	-	69.5	0.7	69.0	0.9	66.1	0.5	76.0	0.7	68.9	1.3	73.0	0.7	76.3	1.4	73.3	0.7	64.2	1.6
CT	26.3	0.3	-	-	-	-	72.0	2.5	70.8	0.5	73.4	0.9	66.4	2.5	75.0	1.8	78.4	0.2	69.9	1.4	65.6	2.0
QC	21.3	0.6	-	-	-	-	-	-	72.2	0.2	76.0	0.5	78.5	1.6	78.7	0.1	77.2	1.5	66.8	1.4	74.2	0.4
SM	37.3	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	74.1	0.3	70.8	0.4	74.1	0.2	75.6	0.4	63.7	0.2	69.9	1.3
FA	68.0	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72.8	1.0	76.6	0.5	67.5	1.4	67.3	0.3	72.4	1.4
GA	15.5	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	76.5	1.1	78.6	0.3	70.7	1.2	69.5	1.6	
MO	64.1	4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78.5	0.2	74.5	1.7	77.2	1.2	
EA	22.4	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	74.3	0.2	76.9	0.1
aTOC	63.7	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67.1	2.5
dTOC	98.9	1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

BHT:Dibutylhydroxytoluene; BHA:Hydroxybutylanisol; CT:Cathechin; QC:Quercechin; SM:Sesamol; FA:Ferulic acid;
 GA:Gallic acid; MO:Morin; EA:Ellagic acid; aTOC:α-Tocopherol; dTOC:δ-Tocopherol; (n=3)

Table 2. 25%阻害濃度での混合系における阻害率と予測値

	BHA		CT		QC		SM		FA		GA		MO		EA		aTOC		dTOC	
	実測	予測	実測	予測	実測	予測	実測	予測	実測	予測	実測	予測	実測	予測	実測	予測	実測	予測	実測	予測
BHT	58.0	55.3	51.0	51.2	51.3	49.8	51.0	48.2	48.7	46.9	48.5	47.3	48.2	46.8	49.0	47.8	49.9	45.9	54.9	51.0
BHA	-	-	51.6	51.1	53.2	49.7	58.2	56.1	58.3	54.2	56.4	53.7	56.9	53.5	53.6	50.0	51.8	48.2	56.2	53.1
CT	-	-	-	-	46.9	45.1	50.7	51.7	37.8	39.0	45.3	46.6	48.7	48.8	45.0	42.2	43.5	43.2	48.0	46.3
QC	-	-	-	-	-	-	57.4	50.8	52.5	48.6	44.9	41.1	52.3	47.9	44.9	41.4	46.4	38.4	52.5	45.6
SM	-	-	-	-	-	-	-	-	52.0	43.5	46.5	44.0	49.0	43.4	52.8	45.1	51.3	44.1	57.6	49.0
FA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48.5	43.9	47.5	40.4	38.4	42.5	45.9	41.5	51.6	46.6
GA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37.5	36.8	43.0	40.7	42.7	37.5	47.1	44.6
MO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44.4	39.8	49.7	41.4	48.5	43.7
EA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43.3	38.8	50.6	44.6
aTOC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49.1	42.5

BHT:Dibutyl-hydroxytoluene; BHA:Hydroxy-butylanisol; CT:Cathechin; QC:Quercechin; SM:Sesamol; FA:Ferulic acid;

GA:Gallic acid; MO:Morin; EA:Ellagic acid; aTOC: α -Tocopherol; dTOC: δ -Tocopherol; (n=3)

実測:混合系における実測阻害率(%); 予測:計算による予測阻害率(%)

Table 3. 予測値との比較及び検定

	BHA	CT	QC	SM	FA	GA	MO	EA	aTOC	dTOC
BHT	1.050	0.996	1.030	1.060	1.040	1.030	1.030	1.020	1.090	1.080
BHA	-	1.010	1.070	1.040	1.080	1.050	1.060	1.070	1.070	1.060
CT	-	-	1.040	0.980	0.969	0.971	0.998	1.070	1.010	1.040
QC	-	-	-	1.130	1.080	1.090	1.090	1.080	1.160	1.150
SM	-	-	-	-	1.200	1.060	1.130	1.170	1.160	1.180
FA	-	-	-	-	-	1.110	1.180	0.903	1.110	1.110
GA	-	-	-	-	-	-	1.020	1.060	1.140	1.060
MO	-	-	-	-	-	-	-	1.120	1.140	1.110
EA	-	-	-	-	-	-	-	-	1.120	1.140
aTOC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.160

BHT:Dibutyl-hydroxytoluene; BHA:Hydroxy-butylanisol; CT:Cathechin; QC:Quercechin; SM:Sesamol;
 FA:Ferulic acid; GA:Gallic acid; MO:Morin; EA:Ellagic acid; aTOC: α -Tocopherol; dTOC: δ -Tocopherol
 表中太字体:相乗効果と認められるもの;表中細字体:相加性と認められるもの;表中斜体:相殺性と認められるもの

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19年度分担研究報告書

チャ抽出物の抗酸化成分に関する研究

分担研究者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

協力研究者 島村 智子 高知大学農学部 准教授

研究要旨

茶が抗酸化活性を示し、その活性にカテキン類が関与していることは良く知られている。しかし、酸化防止剤として使用されている「チャ抽出物」の含有成分に関する基礎情報や酸化防止効果を示す物質に関する情報は不足した状態にある。そこで本研究では、酸化防止剤のチャ抽出物中に存在する抗酸化成分の解明に取り組んだ。DPPH法、WST-1法、HPLC分析、LC/MS分析を用いた解析により、酸化防止剤のチャ抽出物中には、ガロカテキン（GC）、エピガロカテキン（EGC）、エピガロカテキンガラート（EGCg）、ガロカテキンガラート（GCg）、エピカテキンガラート（ECg）が存在しており、これらの物質が主要な抗酸化成分であることが明らかとなった。本研究結果は、抗酸化成分の解明だけでなく、成分含量・組成を指標とした規格基準の設定が遅れている既存添加物に属するチャ抽出物の品質管理に対しても重要な知見になるものと考えられた。

A. 研究目的

茶の機能性は多岐にわたっており、抗酸化活性はその代表的なものである。過去の多くの研究において、茶中に存在する主要な抗酸化成分はカテキン類であることが明らかとされている。酸化防止剤として使用されている「チャ抽出物」は「チャの葉から得られた、カテキン類を主成分とするものをいう。」とされているが、実際に酸化防止剤として使用されているチャ抽出物の含有成分に関する基礎情報は十分でない。また、抗酸化成分に関する情報も不足している。加えて、チャ抽出物を含む既存添加物の成分含量・組成を指標とした規格基準の設定が遅れていることから、品質評価の指標となる成分の解明は重要な意味を持つと考えられる。そこで本研究では、チャ抽出物中に存在する抗酸化成分の解明に取り組んだ。

B. 研究方法

(1) 試料調製

HPLC分析の場合は、チャ抽出物を超純水で2 mg/mlとなるように溶解し、これを孔径0.45 μmのメンブレンフィルターろ過後、分析に用いた。LC/MS分析の場合は、30%メタノールに溶解後、孔径0.20 μmのメンブレンフィルターろ過し、分析に用いた。

(2) HPLC分析

チャ抽出物のHPLC分析は、Del Rioらの方法¹⁾に従い、以下の条件にて行った。装置：LC-10AD VP、SCL-10A VP（島津製作所製）、カラム：Phenomenex Synergi 4 μ MAX-RP80A（4.6 mm id × 250 mm：Phenomenex社製）、カラム温度：30℃、流速：1 ml/min、溶離液：(A) 1% ギ酸、(B) 1% ギ酸

を含むアセトニトリル、グラジエントプログラム：(0分) A : B = 96 : 4、(60分) A : B = 75 : 25、検出：280 nm。

(3) LC/MS 分析

チャ抽出物の LC/MS 分析は下記の条件で行った。装置：Waters 製 LC/MS system、カラム：COSMOSIL C₁₈-MSII (4.6 mm id×150 mm：ナカライテスク製)、流速：0.5 ml/min、溶離液：(A) 0.1% ギ酸、(B) 0.1% ギ酸を含むアセトニトリル、グラジエントプログラム：(0分) A : B = 95 : 5、(30分) A : B = 75 : 25、PDA 検出：280 nm (190–320 nm)、ESI-MS：Negative ion mode、Cone voltage：30 V。

(4) DPPH 法

試料溶液 200 μl に 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μl、99.5%エタノールで調製した 0.2 mM DPPH 溶液 1 ml を順次添加し、室温で暗所にて正確に 30 分間反応させた。その後、517 nm の吸光度 (A_s) を測定した。試料溶液のかわりに水を添加した際の吸光度をコントロール (A_c) として、試料の阻害率 (%) を以下の式で求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

(5) WST-1 法

市販の SOD Assay-Kit WST (同仁化学研究所製) を使用し、添付マニュアルを一部改変して測定を行った。96 穴マイクロプレートに試料溶液 20 μl、WST working solution 200 μl、Enzyme working solution 20 μl を順次添加し、マイクロプレートシェーカー (800 rpm) で室温にて 10 分間攪拌した。その後、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

試料添加時の吸光度を A_{sample}、試料溶液のかわりに水を添加した際の吸光度を A_{blank1}、Enzyme working solution のかわりに Dilution buffer を用いた際の吸光度を A_{blank2}、Enzyme working solution のかわりに Dilution buffer を加え、かつ試料溶液のかわりに水を添加した際の吸光度を A_{blank3} とし、以下の式から各試料の阻害率 (%) を求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

C. 研究結果と考察

本研究では 4 種類のチャ抽出物を試料として用いた。その結果、チャ抽出物に含まれる抗酸化成分は全試料に共通していたことから、そのうち 1 種類のチャ抽出物の分析結果を示した。

(1) HPLC を用いたチャ抽出物に含まれる抗酸化活性画分の特定

チャ抽出物を HPLC 分析した際の溶出液を 3 分ごとに分画し、各画分の DPPH ラジカル消去活性、ならびにスーパーオキシドアニオン消去活性を測定した。HPLC 分析結果を図 1 (A) に、各画分の示す DPPH ラジカル消去活性とスーパーオキシドアニオン消去活性を図 1 (B) と (C) にそれぞれ示した。図 1 (A) 中の数字は各ピークの保持時間を示している。

図 1 (B) に示したように、DPPH 法による測定では、画分 No. 7、No. 11、No. 12、No. 15 の 4 つの画分が高い活性が認められた。また図 1 (C) に示した WST-1 法によるスーパーオキシドアニオン消去活性測定では、画分 No. 4、No. 7、No. 11、No. 12 の 4 つの画分が高い活性が認められた。以上の結果から、画分 No. 4、No. 7、

No. 11、No. 12、No. 15 に主要な抗酸化成分が含まれていると考えられた。続いて、カテキン混合標準溶液の HPLC クロマトグラムとの比較を行った。その結果より、画分 No. 4 のピーク（ピーク 1：保持時間 11.634 分）はガロカテキン（GC）、画分 No. 7 のピーク（ピーク 2：保持時間 18.650 分）はエピガロカテキン（EGC）、画分 No. 11 のピーク（ピーク 3：保持時間 30.288 分）はエピガロカテキンガレート（EGCg）、画分 No. 12 のピーク（ピーク 4：保持時間 33.635 分）はガロカテキンガレート（GCg）、画分 No. 15 のピーク（ピーク 5：保持時間 43.774 分）はエピカテキンガレート（ECg）であると推察された。

(2) LC/MS 分析による抗酸化活性成分の同定

先の結果より、チャ抽出物中に存在する抗酸化成分は GC、EGC、EGCg、GCg、ECg である可能性が高いと考えられた。しかし、これら 5 つの抗酸化成分に相当すると考えられるピークの保持時間とカテキン混合標準溶液に含まれるカテキン類の保持時間に若干の差が認められたため、LC/MS によるより詳しい分析を行うこととした。

図 1 に示したピーク 1 から 5 の LC/MS による分析結果を表 1 に示した。ピーク 1 とピーク 2 の Negative ion mode による分析では、 m/z 305 に分子イオンピークが検出された。カテキン類のうち、GC と EGC の分子量が 306.7 であることから（図 2）、ピーク 1、ピーク 2 は先の実験結果から推定したように GC と EGC のどちらかであると考えられた。Murakami ら² の報告により、逆相 HPLC の条件下において、GC は EGC よりも先に溶出されることが明らかとなっている。このことから、ピーク 1 を GC、ピーク 2 を EGC と同定した。続いて、ピーク 3 とピーク 4 の分析では、 m/z 457 に分子イオンピークが認められた。EGCg と GCg の分子量が 458.08 であることから（図 2）、ピーク 3 とピーク 4 は EGCg と GCg のどちらかであると考えられた。

Murakami ら² により、逆相 HPLC の条件下では、EGCg が GCg よりも先に溶出されると報告されている。従って、ピーク 3 を EGCg、ピーク 4 を GCg と同定した。さらに、ピーク 5 の LC/MS 分析では、 m/z 441 に分子イオンピークが認められた。ECg の分子量が 442.09 であることから（図 2）、ピーク 5 は ECg であると判断した。

最後に、更なる確認のため、チャ抽出物と GC、EGC、EGCg、GCg、ECg の標品を co-injection し、HPLC 分析を行ったところ、ピーク 1 から 5 の各々の増大が認められた。以上の結果より、酸化防止剤「チャ抽出物」に含まれる主要な抗酸化成分は GC、EGC、EGCg、GCg、ECg であることが明らかとなった。

D. 結論

酸化防止剤のチャ抽出物中に存在する抗酸化成分の解明に取り組んだ。DPPH 法、WST-1 法、HPLC 分析、LC/MS 分析を用いた解析結果から、酸化防止剤として使用されているチャ抽出物中には、ガロカテキン（GC）、エピガロカテキン（EGC）、エピガロカテキンガレート（EGCg）、ガロカテキンガレート（GCg）、エピカテキンガレート（ECg）が存在しており、これらの物質が主要な抗酸化成分であることが明らかとなった。本研究結果は、抗酸化成分の解明だけでなく、成分含量・組成を指標とした規格基準の設定が遅れている既存添加物に属するチャ抽出物の品質管理に対しても重要な知見になるものと考えられた。

E. 研究発表

(1) 論文発表

なし

(2) 学会発表

なし

参考文献

- 1) Del Rio, D. *et al.*, HPLC-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2807-2815 (2004).
- 2) Murakami, I. *et al.*, Simultaneous determination of catechins and procyanidins in bottled tea drinks by LC/MS. *Chromatography*, **27**, 27-33 (2006).

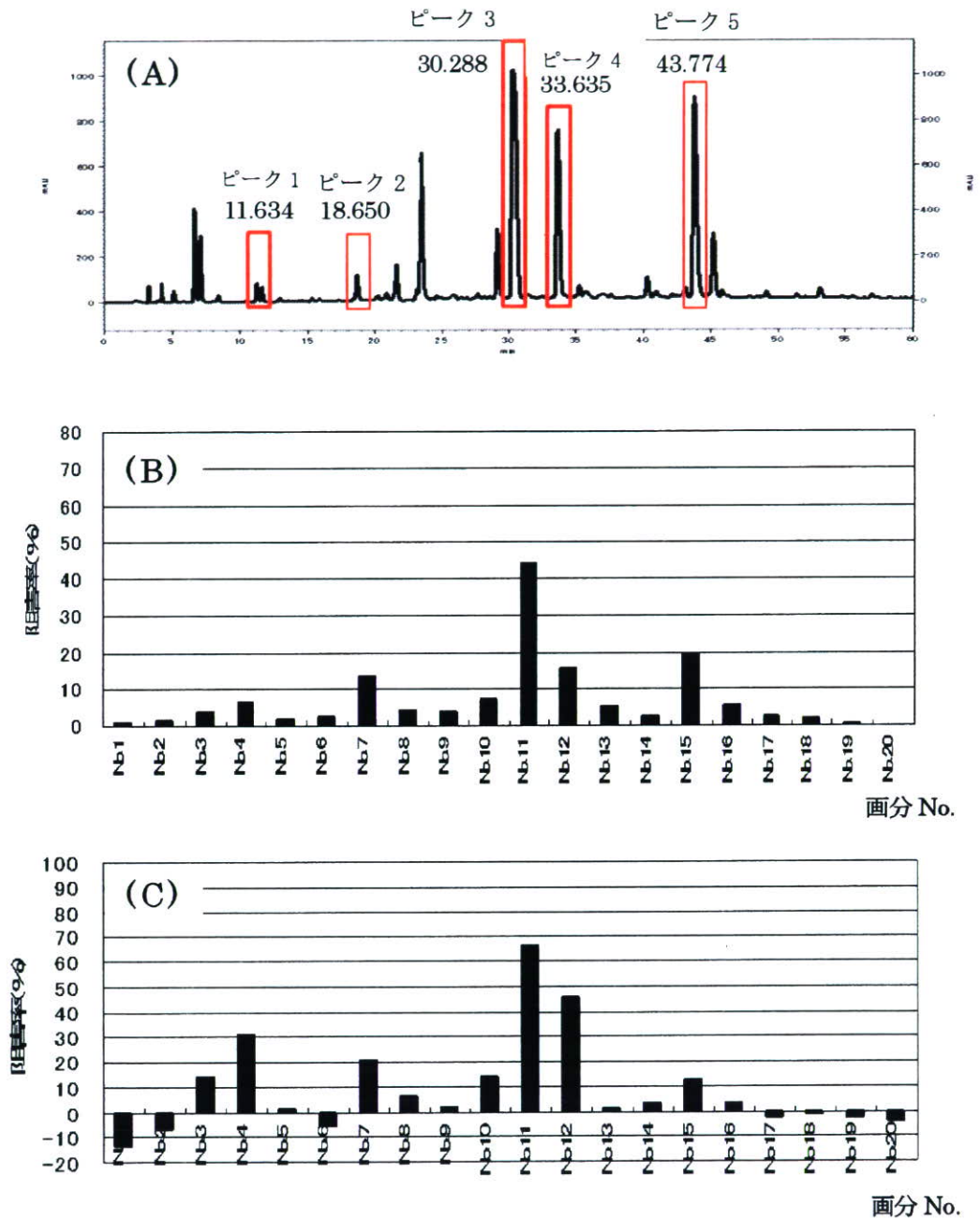
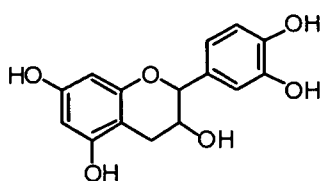


図1 チャ抽出物のHPLCクロマトグラム (A) と各画分の示す抗酸化活性:
 (B) DPPH ラジカル消去活性 (C) スーパーオキシドアニオン消去

表1 Negative ion mode による LC/MS 分析で検出された
分子イオンピークの m/z 値

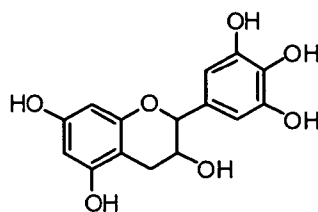
ピーク番号	(M-H) ⁻ m/z	分子量
1	305	306
2	305	306
3	457	458
4	457	458
5	441	442

C, EC

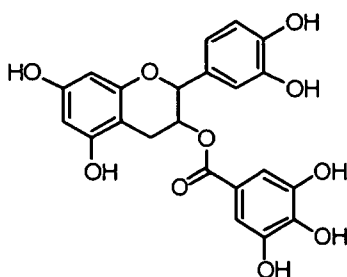


C₁₅H₁₄O₆
Exact Mass: 290.08

GC, EGC

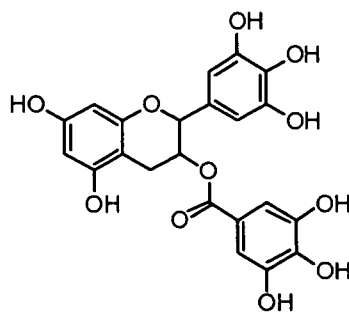


C₁₅H₁₄O₇
Exact Mass: 306.07



C₂₂H₁₈O₁₀
Exact Mass: 442.09

Cg, ECg



C₂₂H₁₈O₁₁
Exact Mass: 458.08

GCg, EGCg

図2 カテキン類の構造と分子量

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 19 年度分担研究報告書

酸化防止剤ローズマリー抽出物に含まれる活性成分の同定

協力研究者 松藤 寛 日本大学生物資源学部 講師
分担研究者 松本 清 九州大学農学研究院 教授
分担研究者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

研究要旨

食品添加物である天然物酸化防止剤の品質規格の設定を目的とし、ローズマリー抽出物に含まれる抗酸化活性成分の同定とこれら成分の抽出物活性への寄与率について検討した。ローズマリー抽出物（A 社粉末試料、B 社液体試料）を HPLC-DPPH on-line ポストカラムシステムに供したところ、どちらの試料においても主要な 3 つのピーク（1, 2, 3）が観察され、ピーク 2 と 3 が主要な DPPH ラジカル消去能を有することが判明した。標準品と UPLC-MS/MS の結果、ピーク 1, 2, 3 はそれぞれロスマリン酸 (RosA)、カルノソール (Car)、カルノシン酸 (CarA) と同定した。これらは抽出物中にそれぞれ、A 社：4.2, 44, 161 mg/g、B 社：0.38, 6.3, 43.3 mg/g 存在した。抽出物およびこれら成分の DPPH ラジカル消去活性を調べたところ、A 社のローズマリー抽出物は $IC_{50}=18.9 \mu\text{g/mL}$ 、RosA は $IC_{50}=2.84 \mu\text{g/mL}$ 、Car は $IC_{50}=6.81 \mu\text{g/mL}$ 、CarA は $IC_{50}=4.77 \mu\text{g/mL}$ であった。抽出物中の主要成分である Car 及び CarA は、抽出物活性の約 75% を占めた。また、既存の抗酸化成分 26 種類とローズマリー抽出物を混合し、その抗酸化活性を調べたところ、他成分による活性上昇は概ね予測の範囲内であった。しかし、アスコルビン酸とカフェ酸の存在下では、予測値よりも 2 割程度の活性上昇が、バニリン酸と *p*-クマル酸の存在下では、2 割程度の活性低下が認められた。

A. 研究目的

天然物酸化防止剤の抗酸化活性測定による品質規格の設定を目的として、その有効（活性）成分の明確化、並びに活性への寄与率について検討した。

ローズマリー抽出物は、「マンネンロウの葉又は花から得られた、カルノシン酸、カルノソール及びロスマノールを主成分とするものをいう。」と既存添加物名簿に定義されている。また、既存添加物名簿収載品目リスト注解書の基原・製法・本質において「シソ科マンネンロウ (*Rosmarinus officinalis* LINNE) の葉又は花より、二酸化炭素、温時～熱時含水エタノール若しくはエタノールで抽出して得られたもの、又は温時～熱時へキサン、メタノール若しくは含水メタノールで抽出し、溶媒を除去して得られたものであ

る。有効成分は、フェノール性ジテルペノイド（ロスマノール、カルノソール及びカルノシン酸等）である」と記載されている。また、「抽出溶剤及び抽出温度によって溶解性が異なり、水溶性及び非水溶性の 2 種類がある」とされている。

一方、ローズマリー中の抗酸化成分についてはいくつかの報告があり、上記成分以外に、エピロスマノール、イソロスマノール、ロスマリン酸、ロスマリジフェノール、ロスマリキノンなどが報告されている（図 1）^{1,2)}。

天然物酸化防止剤の抗酸化活性測定については、DPPH ラジカル消去活性測定法が天然物酸化防止剤の抗酸化能を良好に評価しうるということが、昨年度までの成果により明らかにされている。

そこで、本年度においては、DPPH ラジカル消去活性測定法を利用してローズマリー抽出物中の有効な抗酸化活性成分を明らかにし、それらの寄与率を求めることを試みた。また、他の抗酸化成分が共存した際のローズマリー抽出物の活性に及ぼす影響についても併せて検討した。

B. 研究方法

(1) DPPH ラジカル消去活性測定

a) バッチ法：昨年度同様、Choi ら³⁾の方法を一部変更して行った。すなわち、試験管に試料溶液 200 μ L, 100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 800 μ L, 0.20 mM DPPH エタノール溶液 1 mL を添加し、10 秒間激しく攪拌した後、暗所で常温にて 30 分間静置した。30 分後、反応溶液の 517 nm における吸光度を測定した。試料溶液の代わりに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。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割合から阻害率(%)を求めた。なお、50%の阻害率を示すときの試料濃度(終濃度)を IC₅₀ として示した。

b) 他成分存在下での活性評価：適当濃度の他成分とローズマリー抽出物を等量で混合し、上記バッチ法により DPPH ラジカル消去活性(実測値 I_M)を測定した。また同時に、他成分とエタノールを等量で混合した試料(試料 A)とローズマリー抽出物とエタノールを等量で混合した試料(試料 B)を調製し、これらの DPPH ラジカル消去活性(それぞれ I_A、I_B)を測定した。混合試料の阻害率の予

測値(I_E)は以下の式で計算できると報告されている^{4,5)}。

$$I_E = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B / 100) \cdots (1)$$

実測値(I_M)と予測値(I_E)の平均値の差を対応のある t 検定を行い、危険率 5%で差の有無を評価した。

c) on-line ポストカラム法：既存の方法^{2,6)}を一部改変して行った。すなわち、ローズマリー抽出物(A社粉末試料およびB社液体試料)をそれぞれ 4 mg/mL および 12 mg/mL となるようにエタノールで溶解し、以下の条件の HPLC に供した。カラム：X-bridge™ Shield RP18 (4.6×150 mm, 5 μ m, Waters)、溶媒：30% MeOH (0.1%ギ酸含有) (0分) → 80% MeOH (0.1%ギ酸含有) (20分) → 80% MeOH (0.1%ギ酸含有) (10分)、流速：0.8 mL/min、検出波長：285 nm、温度：40°C、注入量：10 μ L。

HPLCの配管出口に3方ジョイントを取り付け、200 mM MES バッファー(pH 6.0)と 100 μ M DPPH-MeOH 溶液を 1:1 で混合した溶液を流速 0.4 mL/min で流して混合し、反応ユニット (0.25 mm × 15 m, 60°C) で反応させた。反応液を波長 517 nm にて検出し、DPPH ラジカルとの反応によって生じるネガティブピークを検出した。なお、DPPH との反応の前後における検出のずれは約 0.8 分であった。

(2) ローズマリー抽出物の成分分析

ローズマリー抽出物中の成分は、A社 0.2 mg/mL、B社 1 mg/mL となるようにエタノールに溶解し、0.2 μ m のフィルターろ過後、Waters 社製の Quattro Premier を搭載した ACUITY UPLC™ システム(UPLC-MS/MS)

を用いて行った。

UPLC 条件、カラム:ACUITY UPLC™ BEH Shield RP18 (2.1×100 mm, 1.7 μm, Waters)、溶媒:30% MeOH (0.1%ギ酸含有) (0分)→80% MeOH (0.1%ギ酸含有) (10分)→80% MeOH (0.1%ギ酸含有) (3分)、流速:0.2 mL/min、検出波長:250–400 nm、温度:40°C、注入量:5 μL。

MS/MS 条件、イオン化:ESI ネガティブ、キャピラリー電圧:3.5 kV、イオンソース:120°C、脱溶媒ガス:400°C、コーン電圧:30 V、コリジョン電圧:40 V、脱溶媒ガス:800 L/h、コーンガス:50 L/h、コリジョンガス:0.3 mL/min。

C. 研究結果

(1) ローズマリー抽出物中の DPPH ラジカル消去成分

ローズマリー抽出物の UV クロマトグラムおよび DPPH ラジカル消去クロマトグラムを図 2 に示す。A 社粉末試料、B 社液体試料ともに 3 つの主要なピーク (1、2、3) が検出された。これらの中で、ピーク 2 とピーク 3 は、DPPH ラジカル消去クロマトグラムより、ローズマリー抽出物中の主要な抗酸化成分であることが判明した。

(2) UPLC-MS/MS による成分同定

UPLC-MS/MS の結果、ピーク 1 は 287 と 329 nm に吸収極大を示し、ESI ネガティブイオンモードにおいて、 m/z 359 の擬似分子イオンピーク $[M-H]^-$ が得られた (図 3)。さらに、MS/MS 分析において、 m/z 123, 133, 135, 161, 179 のイオンピークが得られ、標準品との保持時間、各種スペクトルの一致により、ピーク 1 はロスマリン酸(RosA)と同定し

た。同様に、ピーク 2 は 284 nm の吸収極大、 m/z 331 $[M-H]^-$ の擬似分子イオンピーク、MS/MS により m/z 271, 287 のイオンピークが観察され、標準品との比較によりカルノソール(Car)、ピーク 3 は 284 nm の吸収極大、 m/z 329 $[M-H]^-$ の擬似分子イオンピーク、MS/MS により m/z 201, 214, 269, 285 のイオンピークが観察され、標準品との比較によりカルノシン酸(CarA)であると同定した。

標準品による検量線の結果、A 社試料中には RosA 4.2 mg/g、Car 44 mg/g、Car A 161 mg/g 存在し、B 社試料中には RosA 0.38 mg/g、Car 6.3 mg/g、CarA 43.3 mg/g 存在した。

(3) DPPH ラジカル消去活性

ローズマリー抽出物、RosA、Car、CarA の DPPH ラジカル消去活性を図 4 に示す。A 社のローズマリー抽出物は $IC_{50}=18.9 \mu\text{g/mL}$ (TEAC=0.257) を示したが、B 社試料は昨年同様白濁して測定することができなかった。一方、主要成分である 3 成分の DPPH ラジカル消去活性を調べたところ、RosA が最も強い活性 ($IC_{50}=2.84 \mu\text{g/mL}$, TEAC=2.26) を示し、続いて CarA ($IC_{50}=4.77 \mu\text{g/mL}$, TEAC=1.34)、Car ($IC_{50}=6.81 \mu\text{g/mL}$, TEAC=0.941) となった。

A 社ローズマリー抽出物 $18.9 \mu\text{g/mL}$ 中の RosA、Car、CarA の含量は標準品の検量線の結果から、それぞれ 0.08, 0.83, $3.04 \mu\text{g/mL}$ であり、この濃度での DPPH ラジカル消去活性は図 4 より RosA 1.3%、Car 6.6%、CarA 31.2% と見積もられた。RosA は最も強い活性を示したが、その含量が少なく、結果として、Car 及び CarA がローズマリー抽出物中の活性の約 75% を占めた。この結果は図 2 と概ね一致した。

(4) 抗酸化物質共存下でのDPPHラジカル消去活性

ローズマリー抽出物と既存の抗酸化成分を混合し、その際の DPPH ラジカル消去活性を測定した (表 1)。*p*-ヒドロキシ安息香酸とアピゲニンはほとんど活性を示さなかったが、その他の抗酸化物質は適当な濃度で活性を示した。これらとローズマリー抽出物を混合したところ、*p*-ヒドロキシ安息香酸を除き、すべての試料で予測値よりも有意に混合試料の活性は増加あるいは減少した。しかし、その多くは 1 割程度の増加あるいは減少であり、活性は概ね予測の範囲内であると考えられた。ただし、アスコルビン酸とカフェ酸の存在下では 1.23 倍の活性増加が、バニリン酸と *p*-クマル酸存在下では 0.8 倍に活性が減少した。

D. 考察

ローズマリー抽出物中の抗酸化成分について検討を行ったところ、その主要な活性成分はカルノソール及びカルノシン酸であり、これらは抽出物活性の約 75% を占めることが判明した。

その他の成分として、抽出物の活性への寄与としてはわずかであるが、ロスマリン酸が検出された。既存添加物名簿においては、主要な成分の一つとしてロスマノール (分子量 346) が記載されている。一方、ロスマノールの異性体であるエピロスマノール、イソロスマノールの存在も報告されている。標準品が入手できず、今回の試料におけるこれらの存在については不明であるが、UPLC-MS/MS の結果において、図 2 の 16.0 分、16.7 分、17.8 分のピークは、いずれも m/z 345 の

擬似分子イオンピーク $[M-H]^-$ を示した (データは示していない)。さらなる検討が必要であるが、これらのピークがロスマノール及びその異性体である可能性を示唆しており、量的にはロスマノールよりもロスマリン酸の方が主要成分の一つであるかも知れない。他方、活性の観点から見ると、15 分から 20 分にかけて溶出するピークはいずれも小さいものの、ロスマリン酸と同等のラジカル反応性を示していることから、抗酸化活性は強いと予想され、これらの含量が多い製品等においては、抽出物の活性への寄与率は変化するであろう。

ローズマリー抽出物は DPPH と良好な直線関係で濃度依存的に反応していること、また他の成分が共存しても多くの場合、ローズマリー抽出物の活性は概ね相加的に上昇することから判断すると、DPPH を用いたバッチ法並びに on-line ポストカラム法を併用することにより、ローズマリー抽出物の有効成分量を活性の観点から見積もることが可能であるかもしれない。しかし、アスコルビン酸とカフェ酸の存在下では 2 割程度の活性増加が、バニリン酸と *p*-クマル酸存在下では 2 割程度の活性減少が認められたことから、これらの共存下では、活性測定による有効成分の見積もりには注意が必要であろう。

E. 結論

DPPH ラジカル消去活性測定法を利用して、ローズマリー抽出物中の有効な抗酸化活性成分について検討した結果、これらの成分はロスマリン酸、カルノソール及びカルノシン酸であることが判明した。カルノソール及びカルノシン酸は抽出物活性の約 75% を占めた。26 種類の抗酸化成分とローズマリー抽

出物を混合したところ、他成分による活性上昇は概ね予測の範囲内であった。

F. 研究発表

(1) 論文発表

なし

(2) 学会発表

松藤 寛、千野 誠、受田浩之、松本 清、
山形一雄：天然酸化防止剤ローズマリー抽出物中の活性成分について 第14回日本食品化学学会学術大会（2008.5、西宮）[発表予定]

参考文献

- 1) H. L. Madsen and G. Bertelsen, *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 271-277 (1995).
- 2) A. Pukalskas et al. *J. Chromatogr. A.*, 1074, 81-88 (2005).
- 3) H-S. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4156-4161 (2000).
- 4) M. Doret et al., *Int. J. Obstet. Gynaec.*, 110, 731-734(2003).
- 5) J. Shi et al., *J. Food Comp. Anal.*, 20, 603-608 (2007).
- 6) T. Oki et al., *J. Food Sci.*, 71, C18-C22 (2006).

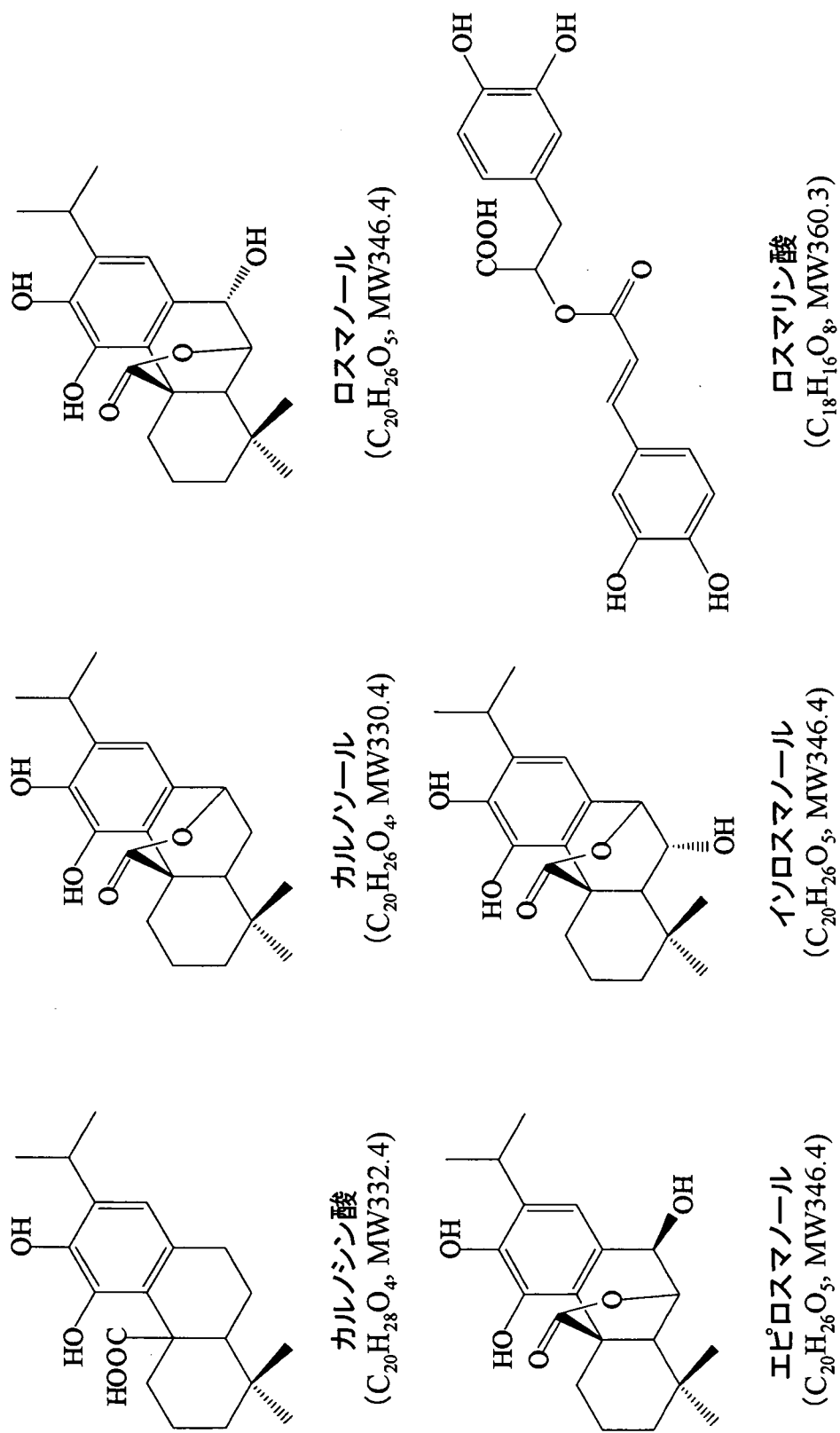


図1 ローズマリーに含まれる既知の抗酸化成分