

Fig. 3. SDS-PAGE of β -amylase products.

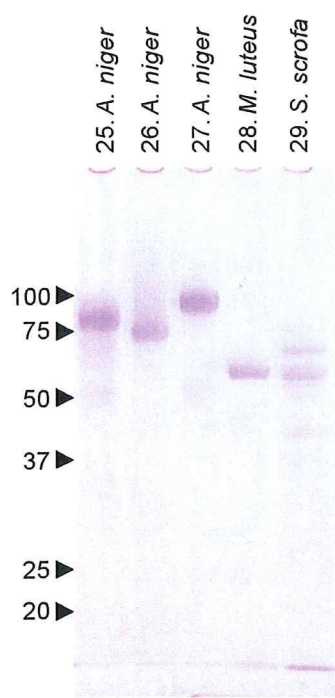


Fig. 4. SDS-PAGE of catalase products.

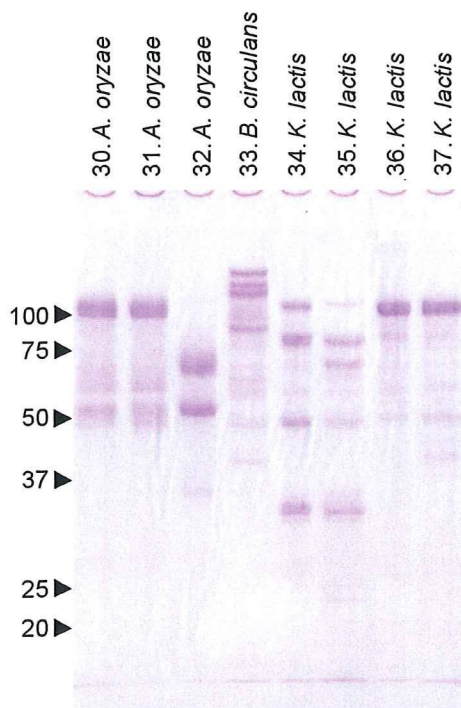


Fig. 5. SDS-PAGE of β -galactosidase products.

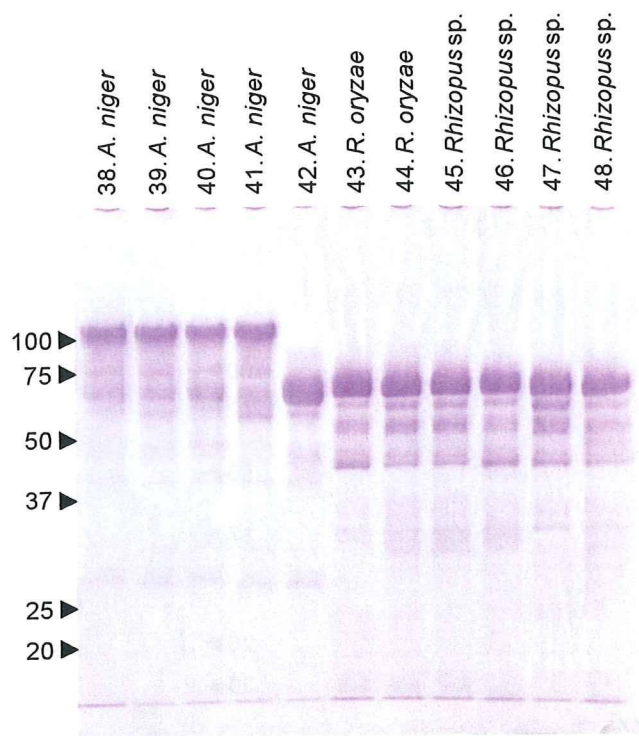


Fig. 6. SDS-PAGE of glucoamylase products.

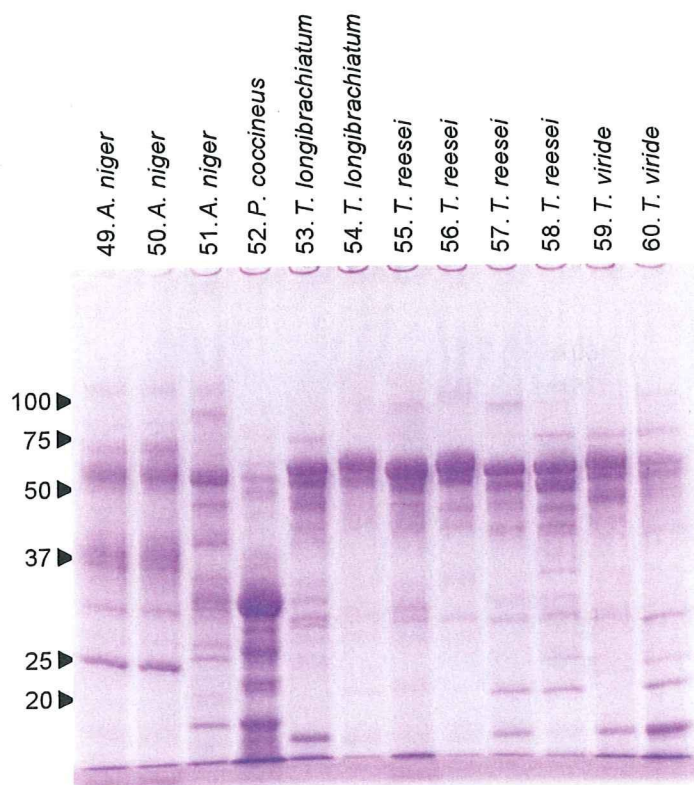


Fig. 7. SDS-PAGE of cellulase products.

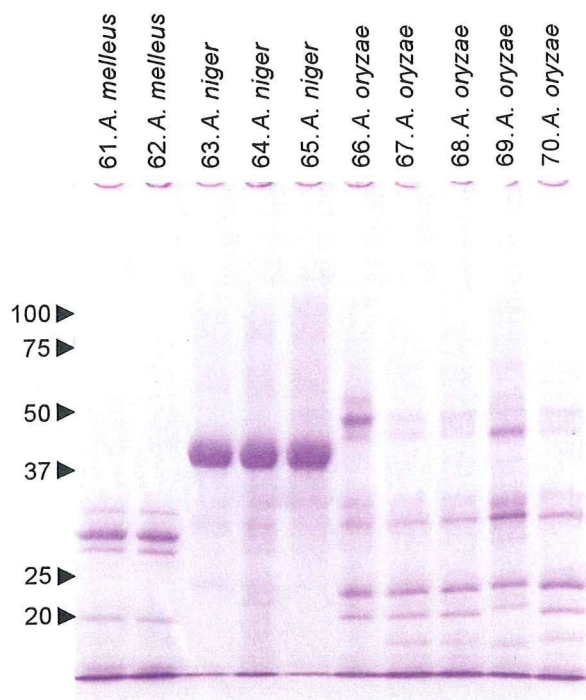


Fig. 8. SDS-PAGE of protease products 61–70.

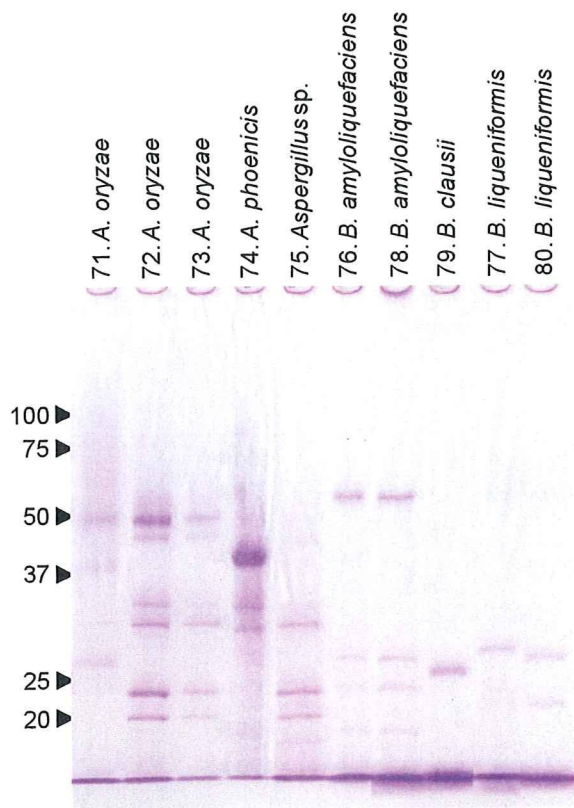


Fig. 9. SDS-PAGE of protease products 71–80.

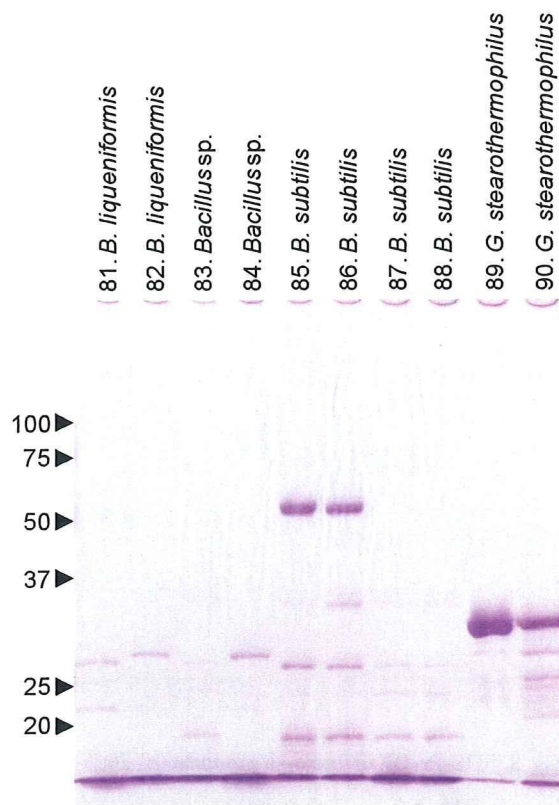


Fig. 10. SDS-PAGE of protease products 81-90.

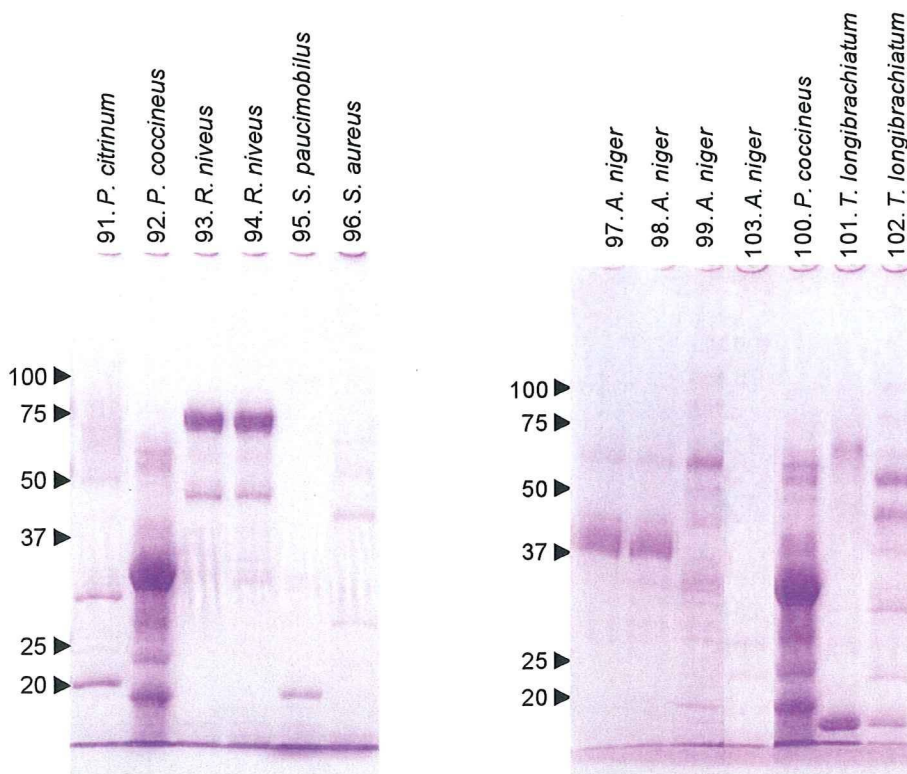


Fig. 11. SDS-PAGE of protease products 91-96.

Fig. 12. SDS-PAGE of hemicellulase products.

Table 1. SDS-PAGE analyses of enzyme products.

Provided information		Results and grouping			
Name ^{*1}	Origin ^{*1}	Sample number ^{*2}	Identical pattern ^{*3}	Similar pattern ^{*3}	Molecular weights of major proteins (kDa) ^{*4}
α -amylase	<i>Aspergillus foetidus</i> ^{*5} <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> and <i>A. oryzae</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Saccharomonospora viridis</i> ^{*6}	1	a		87, 50
		2			64
		3, 4, 5, 6, 7			50
		8	a		87, 50
		9			54, 24
		10, 11, 12, 13	b		54, 43
		14, 15, 17			54
		16	b		54, 43
18			(32), (23)		
β -amylase	<i>Triticum aestivum</i> <i>Glycine max</i> <i>Hordeum vulgare</i>	19		i	55, 38
		24		i	55, 42, 38, 25
		20, 21			54, 29
		22		j	54, 36, 31
		23		j	54, 36
catalase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Micrococcus luteus</i> ^{*7} <i>Sus scrofa</i>	25			80
		26			75
		27			91
		28			57
		29			66, 57
β -galactosidase	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	30, 31			91, 60, 53
		32			69, 53
		33			138, 108, 98, 83
		34			93, 81, 48, 34
		35			93, 81, 69, 48, 34
		36, 37			93, 81, 69, 48
glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i> ^{*8} <i>Rhizopus</i> sp.	38, 39, 40, 41			100, 75, 64
		42			64
		43, 44	c		69, 62, 51, 40
		45, 46, 47, 48	c		69, 62, 51, 40
cellulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Pycnoporus coccineus</i> <i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Trichoderma viride</i>	49, 50			57, 40, 37, 25
		51			57, 50, 42, 26, 18
		52			30, 27, 23, 18
		53		k	58, 54, 16
		54	d	l	61, 55
		55		k	58, 54
		56	d	l	61, 55
		57		k	58, 54, 23, 16
		58		k	58, 54, 23
		59		l	61, 55, 50, 16
60		l	61, 55, 29, 23, 16		

Provided information		Results and grouping			
Name ^{*1}	Origin ^{*1}	Sample number ^{*2}	Identical pattern ^{*3}	Similar pattern ^{*3}	Molecular weights of major proteins (kDa) ^{*4}
protease	<i>Aspergillus melleus</i>	61, 62			32, 29, 27, 19
	<i>Aspergillus niger</i>	63, 64, 65	e		40
	<i>Aspergillus oryzae</i>	66, 72, 73	f	m	47, 31, 22, 20
		67, 68, 70		m	31, 22, 20
		69	f	m	44, 31, 22, 20
		71			47, 26
	<i>Aspergillus phoenicis</i> ^{*9}	74	e		40
	<i>Aspergillus</i> sp.	75		m	31, 22, 20
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	76, 78		n	54, 27
	<i>Bacillus clausii</i> ^{*10}	79			26
	<i>Bacillus licheniformis</i>	77, 82	g		28
		80, 81			27, 22
	<i>Bacillus</i> sp.	83	h		27, 24, 18
		84	g		28
	<i>Bacillus subtilis</i>	85		n	54, 27, 18
		86		n	54, 33, 27, 18
		87, 88	h		27, 24, 18
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ^{*11}	89, 90			31
	<i>Penicillium citrinum</i>	91			30, 20
	<i>Pycnoporus coccineus</i>	92			32, 27, 23, 18
<i>Rhizopus niveus</i>	93, 94			67, 44	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ^{*12}	95			18	
<i>Streptomyces aureus</i>	96			40, 27	
hemicellulase	<i>Aspergillus niger</i>	97, 98			40
		99			59
		103			27, 22
	<i>Pycnoporus coccineus</i>	100			32, 27, 23, 18
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	101			63, 16
		102			53, 43

*1: Names and origins are provided by manufacturers.

*2: Samples with the same information and identical SDS-PAGE pattern are placed in the same row.

*3: Samples with different information and identical or similar pattern are marked.

*4: Molecular weights of major proteins are calculated according to band mobility. Figures in parentheses indicate bands that appear only when large amount of a sample are loaded.

*5–12: Latin names of these producer microorganisms had been changed. Former names were as follows. *5, *Aspergillus aureus*; *6, *Thermomonospora viridis*; *7, *Micrococcus lysodeikticus*; *8, *Rhizopus delemar*; *9, *Aspergillus saitoi*; *10, *Bacillus subtilis*; *11, *Bacillus stearothermophilus*; *12, *Pseudomonas paucimobilis*.

D. 既存添加物の規格作成に向けての検討

7. 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究（概要）

平成21年度 既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発
—既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—
研究報告書（概要）

研究協力者 高橋 仁一 日本食品添加物協会 常務理事

研究概要

当協会は、これまでも既存添加物の成分規格設定を目標に、行政並びに学識経験者のご指導のもと、当協会としての自主規格の策定を進めてきた。本年度は、新たに6品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、6品目について第4版既存添加物自主規格の見直しを行った。これらの作業は、これまでと同様に当協会技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。具体的には、既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。なお、必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、自主規格（案）を改定するとともに、その妥当性評価を行った。また、酵素については、EUの新しい食品酵素規制に関する調査研究を行った。

はじめに

当協会は、これまでも既存添加物の成分規格設定を目標に、行政並びに学識経験者のご指導のもと、当協会としての自主規格の策定を進めてきた。

平成14年11月は、これまで蓄積してきた189品目の自主規格を収録した「第三版既存添加物自主規格」を刊行した。しかしながら、既存添加物418品目のうち、公定規格及び自主規格の策定済み品目は凡そ半数に留まっていたため、新規規格策定を継続し、平成15年度に19品目の自主規格の策定を行ってきた。

平成16年度は、第8版食品添加物公定書への収録候補品目を中心に、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部との間でその規格・試験法の妥当性を検討し、38品目について見直し改定を行った。平成17年度には、新たに9品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、1品目について見直し改定を行った。平成18年度には、新たに4品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、30品目について見直し改定を行った。平成19年度には、新たに22品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、26品目について見直し改定を行った。

平成20年度は、第8版食品添加物公定書の公表を機に、既存添加物等の自主規格案の策定・蓄積結果の集大成及び既収録規格の見直しを実施し、「第4版既存添加物自主規格」を刊

行し、既収録の142品目（既存添加物123品目及び一般飲食物添加物19品目）に加えて78品目を新規収録した。また、新たに18品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、11品目について「第4版既存添加物自主規格」の見直し改定を行った。なお、自主規格未策定品目には、製造業者の特定が困難である場合や、当該製造業者の協力が得られない場合等多いことから、平成19年度に導入した「参考規格」の概念を継続適用することにより策定品目の拡大を推進した。また、「第4版既存添加物自主規格」の試験法について妥当性を確認するため、検証作業を実施した。

本年度は、新たに6品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、6品目について第4版既存添加物自主規格の見直しを行った。

これらの作業は、これまでと同様に当協会技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。具体的には、既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。なお、必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、自主規格（案）を改定するとともに、その妥当性評価を行った。

また、酵素については、EUの新しい食品酵素規制に関する調査研究を行った。

1. 研究方法

1-1. 自主規格の策定及び見直し

本研究は、当協会技術委員会の自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当が中心となって推進した。これまでと同様に既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、適切な安全性確保が図れるよう、自主規格（案）を策定し、その妥当性を評価した。

新規規格策定に当たっては、主成分の確認、定量法の開発検討等を中心に行い、規格・試験法の設定並びにその妥当性等に関して評価・検討を行った。

1-2. EUの新しい食品酵素規制に関する調査研究

2009年1月に施行されたEUの食品改良剤一括法に係る共通規則、及び食品酵素規則並びに登録・評価ガイドラインの調査研究を行った。

2. 調査研究者

これら評価・検討を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーは別紙に記したとおりである。

3. 研究結果の概要

3-1. 自主規格の策定及び見直し

本年度は以下の品目について、「新規規格設定のための調査研究と規格案の策定」及び「当協会第4版既存添加物自主規格として定められている規格・試験法及びこれまでに策定した自主規格案の内容についての見直し」を行った。なお、必要に応じ新たな試験方法の導入を検討し、それらの妥当性に関して評価・検討した。

(1) 平成21年度 新規規格作成検討（6品目）

本年度の新規規格作成検討品目は表1のとおりである。

(2) 既設定規格の見直し（6品目）

本年度は、「第4版 既存添加物 自主規格」（平成20年10月刊行）収載品目及び自主規格案策定済品目について見直しを行った。

本年度見直しを行った品目及び見直しの概要は表2のとおりである。

表1 新規規格作成検討品目

用途分類（検討品目数）	自主規格作成検討品目
増粘安定剤（1品目）	エレミ樹脂
酸化防止剤（2品目）	ドクダミ抽出物（参考規格）、ソバ全草抽出物
酵素（1品目）	イソマルトデキストラナーゼ
苦味料等（1品目）	ゲンチアナ抽出物（参考規格）
製造用剤・ミネラル（1品目）	海藻灰抽出物

表2 既設定規格の見直し検討品目

用途分類（品目数）	検討品目	見直しの概要
着色料（4品目）	褐色系色素4品目	褐色系色素4品目（タマネギ色素、タマリンド色素、クロー色素、カキ色素）の確認試験における差別化の検討を行った。
乳化剤（1品目）	植物性ステロール	精製植物ステロール」の定量法中のフィトステロールの計算式（係数）等について見直し検討を行った。
製造用剤・ミネラル（1品目）	くん液	新たにヘプタナールの含量規格及び試験方法を追加すると共に、純度試験の重金属試験を鉛試験に変更した。

3-2. EUの新しい食品酵素規制に関する調査研究

2009年1月に施行されたEUの食品改良剤一括法に係る共通規則、及び食品酵素規則並びに登録・評価ガイドラインの調査研究を行った。規則 No. 1331/2008 共通認可手続、規則 No. 1332/2008 食品酵素、及びEFSAガイドラインの翻訳を行うと共に各規則、ガイドラインの概要についてまとめ上げた。

関しては、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の山崎壮先生をはじめとする諸先生方並びに当協会顧問である山田隆先生には多大なるご指導をいただいた。この場をお借りし心より感謝申しあげる次第である。

4. 研究結果の詳細

(1) 自主規格の策定及び見直し

研究結果の詳細は、別冊の別紙資料1のとおりである。

(2) EUの新しい食品酵素規制に関する調査研究

調査研究結果の詳細は、別冊の別紙資料2のとおりである。

5. 考察

本年度は6品目の新規自主規格策定検討及び6品目の既設定規格・規格案の見直しを行った。

規格検討内容の概要は既に述べてきた通りであるが、本年度も、規格案を作成した段階で当協会顧問の山田隆先生に規格案の全面的レビューと問題点の抽出をしていただき、必要に応じて修正するという一連の作業を繰り返し行った。これにより、本年度新規策定及び改定した規格内容は、よりの確なものになったと考えている。また、2009年1月に施行されたEUの食品改良剤一括法に係る共通規則、及び食品酵素規則並びに登録・評価ガイドラインの調査研究を行った。

既存添加物の自主規格及び自主規格案の新規策定に関しては、第3次既存添加物消除予備調査における復活品目のうち自主規格及び自主規格案未作成品目(14品目)を中心に策定作業を進めると共に第9版食品添加物公定書への対応検討等に基づく策定規格及び規格案の内容充実のための規格見直しについても検討作業を進めて行く所存である。

本年度自主規格策定あるいは見直し作業に

調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	高橋仁一	日本食品添加物協会
自主規格・規格専門委員長	大倉裕二	キリン協和フーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	相田忠	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	浅田敏	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	伊藤秀行	理研ビタミン株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	植田実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	長田裕次	三菱商事フードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小野茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	皆藤光雅	三菱化学フーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島敏貴	上野製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	唐澤昌彦	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	北村智	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	西山浩司	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	坂井昭浩	オルガノフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	尾崎史浩	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	岩間保憲	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	田中正剛	ダイワ化成株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	関谷史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	深尾正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	宮野信雄	株式会社タイショーテクノス
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村上和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	佐藤祐一	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	橋本成久	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本隆志	小川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	吉武繁廣	エーザイフード・ケミカル株式会社
技術顧問	山田隆	日本食品添加物協会

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
松藤寛、佐々怜一郎、 本間友輝、宮島拓臣、 千野誠、山崎壮、島村智子、 受田浩之、松井利郎、 松本清、山形一雄	抗酸化物質の2成分 混合系における DPPH ラジカル消去 活性	日本食品科学工 学会誌	56 (3)	129-136	2009
杉本直樹、多田敦子、末松 孝子、有福和紀、齋藤剛、 井原俊英、吉田雄一、久保 田領志、田原麻衣子、清水 久美子、伊藤澄夫、山崎壮、 河村葉子、西村哲治	定量 NMR を用いた コチニール色素中の カルミン酸の絶対定 量	食品衛生学雑誌	51 (1)	19-27	2010
Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.	Quantitative dertermination of atractylon in Atractylodis Rhizoma and Atractylodis Lanceae Rhizoma by ¹ H-NMR spectrometry	Journal of Natural Medicines	64 (2)	161-166	2010
石川洋哉、松本清、受田浩 之、島村智子、松藤寛、山 崎壮	食品の抗酸化能評価 法	FFI ジャーナル	215 (1)	5-16	2010
秋山卓美、佐々木亮、山崎 壮、棚元憲一、山形一雄、 河村葉子	SDS-PAGE による既 存タンパク質酵素のタ ンパク質分離パター ン	日本食品化学学 会誌	17	印刷中	2010

抗酸化物質の2成分混合系における DPPH ラジカル消去活性

松藤 寛^{*1}§, 佐々怜一郎^{*1}, 本間友輝^{*1}, 宮島拓臣^{*1}, 千野 誠^{*1}, 山崎 壮^{*2},
島村智子^{*3}, 受田浩之^{*3}, 松井利郎^{*4}, 松本 清^{*4}, 山形一雄^{*1}

^{*1} 日本大学生物資源学部食品科学工学科

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所

^{*3} 高知大学農学部

^{*4} 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activity of Binary Mixtures of Antioxidants

Hiroshi Matsufuji^{*1}§, Ryoichiro Sasa^{*1}, Yuki Honma^{*1}, Hiromi Miyajima^{*1}, Makoto Chino^{*1},
Takeshi Yamazaki^{*2}, Tomoko Shimamura^{*3}, Hiroyuki Ukeda^{*3}, Toshiro Matsui^{*4},
Kiyoshi Matsumoto^{*4} and Kazuo Yamagata^{*1}

^{*1} Department of Food Science and Technology, College of Bioresource Sciences,
Nihon University, Kameino 1866 Fujisawa, Kanagawa 252-8510

^{*2} Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences,
Kamiyoga 1-18-1 Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

^{*3} Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe-B 200, Nankoku, Kochi 783-8502

^{*4} Division of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School
Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

The effect of a binary mixture of antioxidants on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was investigated using 11 antioxidants as food additives or 24 natural antioxidants. Among 55 combinations of binary mixtures, including 11 antioxidants, BHA, BHT, catechin, quercetin, sesamol, ferulic acid, gallic acid, morin, ellagic acid, α -tocopherol, and δ -tocopherol, the DPPH radical scavenging activity of 36 combinations were significantly greater than the expected activity of individual antioxidants, resulting in synergistic effects. Also, one combination showed antagonistic effect. Among 276 combinations of 24 natural antioxidants, including 4 benzoic acids, 3 cinnamic acids, 12 flavonoids, 2 vitamins, and 3 diterpenes, 74 showed synergistic effects and 61 showed antagonistic effects. However, the ratios of the actual to expected activity of many synergistic and antagonistic combinations were about 1.1-1.2 and 0.8-0.9, respectively. (Received Aug. 20, 2008 ; Accepted Dec. 3, 2008)

Keywords : antioxidant, antioxidant activity, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity, synergy, antagonism
キーワード: 酸化防止剤, 抗酸化活性, DPPH ラジカル消去活性, 相乗効果, 相殺効果

2008年1月現在, 我が国では酸化防止剤として19品目が指定添加物として, 42品目が既存添加物として認可されている¹⁾。指定添加物と異なり, 既存添加物の多くは天然由来の複雑な混合物であることから, 有効成分および成分組成の特定が困難であり, 有効成分含量あるいは成分組成を指標とした規格基準の設定が遅れている。網羅的な成分組成の確認, 有効成分の同定, および定量法の開発がなさ

れているものの²⁾³⁾, 現状の機器分析では不可能である場合も多い。このような背景のもと, 著者らは抗酸化活性評価により, 酸化防止剤の品質評価ができるのではないかと考え, 酸化防止剤の抗酸化活性について検討を行ってきた。前報⁴⁾において, 抗酸化活性の一つとしてラジカル消去活性を分光学的に測定する1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法および2,2'-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 法は, 単一の成分からなる酸化防止剤を高い測定精度をもって活性を評価しうること, またその活性は高い直線性をもって濃度依存性を示すことを明らかにした。今後は, 単一ではなく, 天然物由来の複

^{*1} 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

^{*2} 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*3} 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

^{*4} 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

§ 連絡先 (Corresponding author), hmatsufu@brs.nihon-u.ac.jp

雑な組成を持つ酸化防止剤に対する適用性、すなわち有効成分濃度と活性との相関を調べるのが大きな課題となる。

しかし、有効成分間あるいは含有成分が活性測定時に互に相互作用を引き起こす場合、活性値から濃度を見積もることは困難となる。すなわち、相乗効果を有する場合、活性値から濃度を見積もると、実際の濃度よりも高く見積もることになり、相殺効果を有する場合は低く見積もることになる。実際、抽出液などの複合系においては、しばしば抗酸化物質の濃度と活性との間に相関がないことが報告され、その詳細は不明であるが、成分間の何らかの相互作用すなわち相乗効果あるいは相殺効果によるものと推察されている^{5)~7)}。

アスコルビン酸と α -トコフェロールは相乗効果を示す代表的な組み合わせであり、*in vitro*⁸⁾⁹⁾ および *in vivo*¹⁰⁾ において相乗効果を示すことが確認されている。これはアスコルビン酸と α -トコフェロールがラジカルを消去するだけでなく、 α -トコフェロールがラジカルを消去した反応体をアスコルビン酸が還元し、 α -トコフェロールへと再生することによって考えられている。その他の組み合わせでは、Pekkarinenら¹¹⁾ はリノール酸メチルの酸化試験系において、フラボノイドであるミリセチンおよびルチンは α -トコフェロールの存在下で相乗的な抗酸化性を示すが、ケルセチンは相加的な抗酸化性を示すことを報告している。Hiramotoら¹²⁾ は、水相とヘキサン相からなる二相系での DPPH ラジカル消去活性測定系において、アスコルビン酸と α -トコフェロールの混合は相乗効果を示すものの、カテキン類やフラノン類などは相乗効果を示さないとしている。一方、Murakamiら¹³⁾ は、DPPH-HPLC 法とリポソーム酸化の 2 つの試験系を用いたところ、エピガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、ケルセチンは α -トコフェロール存在下において DPPH-HPLC 法では相加的な抗酸化性を示すが、リポソーム酸化系では相乗的な抗酸化性を示すことを明らかにしている。組み合わせは無数であり、詳細な報告はあまり無いが、成分間の相互作用の有無は試料濃度および選択する抗酸化試験法に依存すると考えられている。

そこで、本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単一からなる酸化防止剤 11 種の 2 成分混合系 (55 通り) における抗酸化効果を DPPH ラジカル消去活性を用いて 2 つの濃度レベルで検討した。さらに、構造活性相関およびその他の成分影響の観点から、安息香酸類、桂皮酸類、フラボノイド類、ビタミン類、ジテルペン類の 24 種の抗酸化成分を用い、その組み合わせ (276 通り) での抗酸化効果も併せて検討した。

実験方法

1. 試薬

DPPH は和光純薬工業製を用いた。単一の化合物からな

る酸化防止剤 11 種: BHA, BHT, (+)-カテキン (CT), ケルセチン (QC), *trans*-フェルラ酸 (Fer), 没食子酸 (GA), モリン (MO), セサモール (SM) は東京化成製, D- α -トコフェロール (aTOC) は MP Biochemical 製, D- α -トコフェロール (dTOC), エラグ酸 (EA) は Sigma 製を用いた。安息香酸類 4 種; p-ヒドロキシ安息香酸 (pHyB), バニリン酸 (VA), プロトカテク酸 (PA) と没食子酸を、桂皮酸類 3 種; カフェ酸 (Caf), p-クマル酸 (pCou) とフェルラ酸を、フラボノイド類 12 種; アピゲニン (AG), ルテオリン (LT), ケンフェロール (KM), ケルセチン, モリン, ミリセチン (MC), ルチン (RT), フィセチン (FT), タキシフォリン (TX) シアニジン (CY), ペラルゴニジン (PG) とカテキンを、ビタミン類 2 種; アスコルビン酸 (AA) と α -トコフェロールを、ジテルペン類 3 種; ロスマリン酸 (Ros), カルノシン酸 (CarA), カルノソール (Car) は和光純薬工業, 東京化成, フナコシあるいは Sigma 社より購入した。その他の試薬は市販の特級試薬を、水は Milli-Q 水を用いた。

2. DPPH ラジカル消去活性測定法

前報⁴⁾ に準じて行った。すなわち、エタノールに溶解した試料 200 μ l に 0.1 mol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μ l, 0.2 mmol/l DPPH-エタノール溶液 1 ml を順次添加し、10 秒間攪はん後、室温暗所下にて 30 分間放置した。その後、517 nm の吸光度 (As) を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した際の吸光度をコントロール (Ac) として、試料の消去率を以下の式で求めた。また、50% 消去率を与える試料溶液の濃度を IC₅₀, 25% 消去率を与える試料濃度を IC₂₅ とした。

$$\text{消去率 (\%)} = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100 \quad (1)$$

3. 2 成分混合系の評価

終濃度がそれぞれ IC₅₀ 値あるいは IC₂₅ 値の濃度になるように 2 成分の混合溶液を作成した。すなわち、IC₅₀ 値または IC₂₅ 値の 2 倍となる濃度溶液を調製し、等量で混合した。この溶液を用いて、上記方法にて DPPH ラジカル消去活性 (I_M) を測定した。

一般的に DPPH ラジカル消去活性は調製した DPPH 濃度や反応時間に影響を受けることから、標準物質としてトロロックスを同時に測定し、トロロックス等量 TEAC として規格化されることが多い。しかし、本試験においては 2 成分間の影響を見ることを目的とするため、トロロックスでの規格化は行わず、代わりに試料 A + 試料 B の混合物の活性測定と同時に、毎回試料 A と試料 B (それぞれ 2 倍希釈) を測定することとした。

4. 予測値との比較

試料 A と試料 B の混合試料の消去率の予測値 (I_E) は、既報¹⁴⁾¹⁵⁾ に従い、以下の式で求めた。

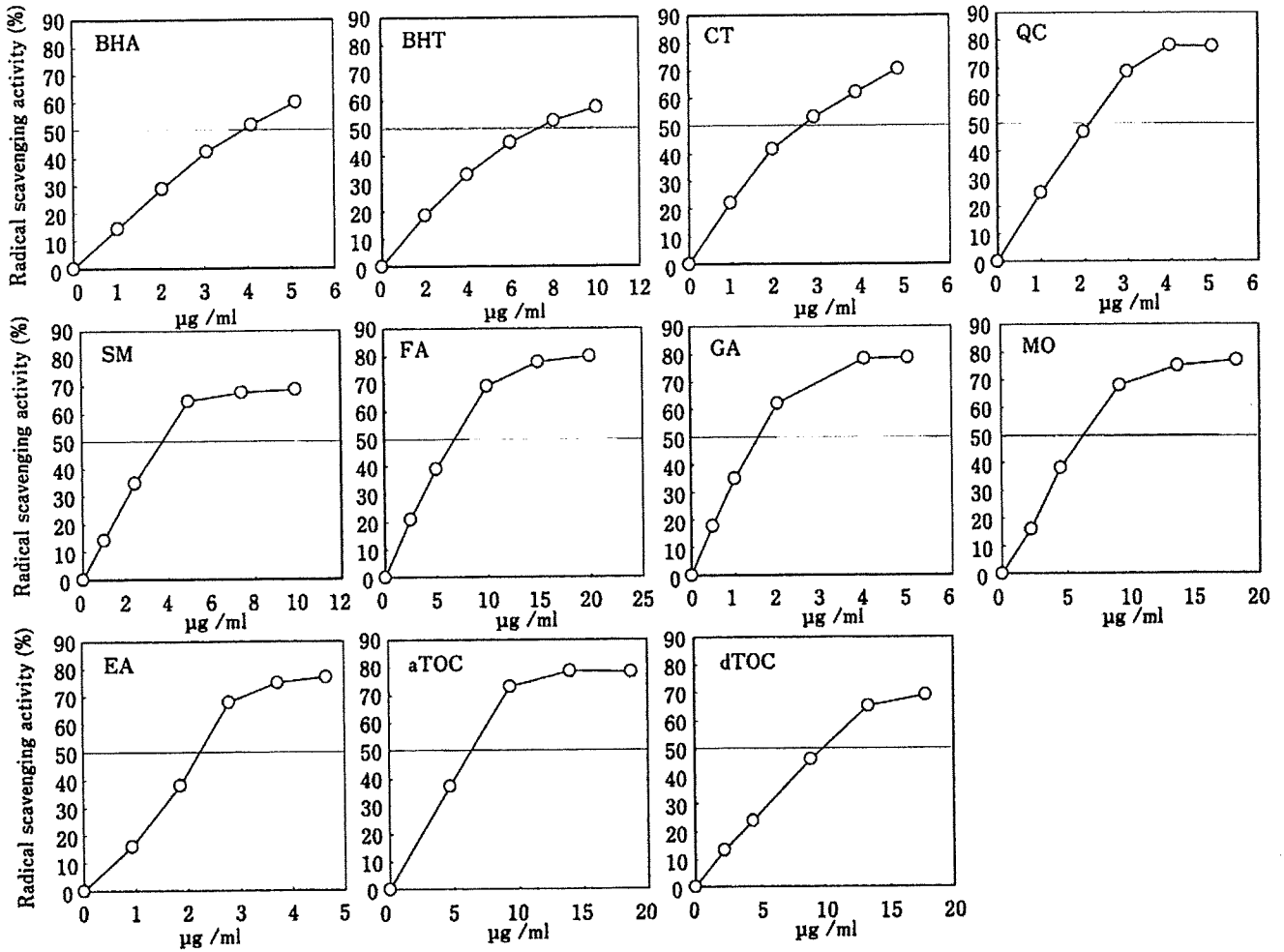


図 1 酸化防止剤の DPPH 消去活性

$$I_E = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B / 100) \quad (2)$$

ここで I_A は試料 A の消去率, I_B は試料 B の消去率を示す。

したがって, この予測値 I_E と実測値 I_M とを比較し, 混合系の消去率に及ぼす影響を評価した。評価基準は, t 検定により予測値 I_E と実測値 I_M 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。 I_E/I_M 比が 1 以上で有意差ありの場合を相乗効果, 1 以下で有意差ありの場合を相殺効果, それ以外の場合を相加効果と判定した。なお, 本実験は独立した系で最低 3 回繰り返して行い, I_E/I_M 比が大きい (1.2 以上) あるいは小さい場合 (0.8 以下) は計 6 回繰り返して行った。

実験結果

1. 各試料の DPPH ラジカル消去活性

各種酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性を図 1 に示す。本実験で用いた 11 種類の酸化防止剤の活性は, 濃度依存的に上昇したが, 消去率 60~70% を示す濃度以上から頭打ちを示す傾向が認められた。しかし, 60% の消去率を

示す濃度までは相関係数 0.96 以上の直線性をもって DPPH ラジカルを消去した。そこで, 本試験法を用いて 2 成分の混合系による評価を試みることにした。

2. 50% 阻害濃度における混合系評価

まず, 終濃度がそれぞれ IC_{50} 値の濃度になるように 2 成分の混合溶液を作製し, 11 種のすべての組み合わせ (55 通り) で DPPH ラジカル消去活性を測定した。表 1 に示すように, 各混合系の組み合わせは 64.2% (dTOC と BHA) から 78.8% (aTOC と BHT) の範囲にあった。50% 阻害濃度の組み合わせによることから, 混合物の阻害率は 100% 近い値を出すと思われたが, 結果的には 75% 前後であり, 混合物の阻害率は個々の阻害率の足し算にはならないと考えられた。一方, 式 (2) においては, 消去率 50% を示す 2 成分の混合試料の消去率は 75% を示すと予測される。したがって, 本結果は予測値から大きく外れるものではなく, 成分の混合による活性は, 相加的に上昇すると考えられた。しかし, 図 1 に示すように, DPPH 消去活性測定はいくつかの試料においては消去率 60~70% 以上で濃度依存的ではなく頭打ちを示すことから, 高い消去率を示す濃度

表 1 酸化防止剤の 50%消去濃度での 2 成分混合系における消去率 (%)

	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	BHA	BHT	CT	QC	SM	Fer	GA	MO	EA	aTOC	dTOC
BHA	3.89 \pm 0.07	—	73.4 \pm 0.4	69.5 \pm 0.7	69.0 \pm 0.9	66.1 \pm 0.5	76.0 \pm 0.7	68.9 \pm 1.3	73.0 \pm 0.7	76.3 \pm 1.4	73.3 \pm 0.7	64.2 \pm 1.6
BHT	7.32 \pm 0.13	—	—	75.9 \pm 0.3	74.1 \pm 1.6	70.3 \pm 0.2	77.6 \pm 0.4	73.9 \pm 0.9	76.5 \pm 1.2	76.9 \pm 0.6	78.8 \pm 0.2	72.3 \pm 1.4
CT	2.63 \pm 0.03	—	—	—	72.0 \pm 2.5	70.8 \pm 0.5	73.4 \pm 0.9	66.4 \pm 2.5	75.0 \pm 1.8	78.4 \pm 0.2	69.9 \pm 1.4	65.6 \pm 2.0
QC	2.13 \pm 0.06	—	—	—	—	72.2 \pm 0.2	76.0 \pm 0.5	78.5 \pm 1.6	78.7 \pm 0.1	77.2 \pm 1.5	66.8 \pm 1.4	74.2 \pm 0.4
SM	3.73 \pm 0.01	—	—	—	—	—	74.1 \pm 0.3	70.8 \pm 0.4	74.1 \pm 0.2	75.6 \pm 0.4	63.7 \pm 0.2	69.4 \pm 1.3
Fer	6.80 \pm 0.06	—	—	—	—	—	—	72.8 \pm 1.0	76.6 \pm 0.5	67.5 \pm 1.4	67.3 \pm 0.3	72.4 \pm 1.4
GA	1.55 \pm 0.04	—	—	—	—	—	—	—	76.5 \pm 1.1	78.6 \pm 0.3	70.7 \pm 1.2	69.5 \pm 1.6
MO	6.41 \pm 0.41	—	—	—	—	—	—	—	—	78.5 \pm 0.2	74.5 \pm 1.7	77.2 \pm 1.2
EA	2.24 \pm 0.08	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	74.3 \pm 0.2
aTOC	6.37 \pm 0.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	67.1 \pm 2.5
dTOC	9.89 \pm 0.17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

値は 3 回の繰り返し測定での平均値 \pm 標準偏差で表示。

表 2 酸化防止剤の 25%消去濃度での 2 成分混合系における消去率 (I_M) と予測値 (I_E)

	BHA		BHT		CT		QC		SM		Fer		GA		MO		EA		aTOC		dTOC		
	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	
BHA	—	—	58.0	55.3	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	
BHT	—	—	—	—	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	
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	
Fer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	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	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
EA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
aTOC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
dTOC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

値は 3 回あるいは 6 回の繰り返し測定での平均値で表示。

での混合系評価だけでは、2 成分間の影響を十分に反映しないと考えられた。そこで次に直線性の範囲内に入る IC₂₅を示す濃度での混合系の評価を行った。

3. 25% 消去濃度における混合系評価

IC₅₀ 値を示す濃度の試料を調製後、これを等量で混合した 2 成分の混合溶液を作製し、11 種のすべての組み合わせ (55 通り) での活性を測定した。また、測定時の誤差を軽減するために、各試料の阻害率を混合試料と同時に毎回測定し、各試料の消去率 (式 (2) における I_A および I_B) を求めた。表 2 にすべての組み合わせの実測消去率 (I_M) と予測消去率 (I_E) を示す。概ね I_M と I_E は一致する傾向を示した。各組み合わせにおける平均値の差の有意差を判定した組み合わせを図 2 に示す。比の値が 1 以上で有意差ありの組み合わせは相乗効果、比の値が 1 以下で有意差ありの組み合わせは相殺効果と判定したところ、55 通りの組み合わせのうち、36 通りで相乗効果、1 通り (フェルラ酸とエラグ酸) で相殺効果が観察された。しかし、どちらの効果においてもその比は最大で 1.2 程度、最小で 0.9 程度であり、わずかに相乗効果を上回る、あるいは下回る程度であった。

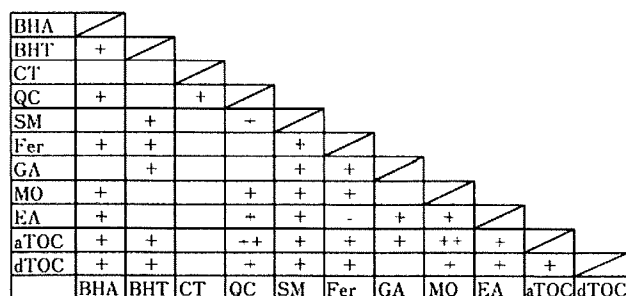


図 2 酸化防止剤の組み合わせによる DPPH ラジカル消去活性予測値に対する効果

+ : I_M/I_E の比が 1.0 以上 1.2 未満で有意差あり。

++ : I_M/I_E の比が 1.2 以上で有意差あり。

- : I_M/I_E の比が 0.8 以上 1.0 未満で有意差あり。

4. 他成分における混合系評価

検討した 11 種類の酸化防止剤の混合系における抗酸化効果が、わずかに相乗効果を上回る、あるいは下回る程度であったことから、いくつかの他成分を用いて同様に検討した。すなわち、安息香酸類 4 種、桂皮酸類 3 種、フラボ

ノイド類 12 種, ビタミン類 2 種, ジテルペン類 3 種を用いて, 計 276 通りの組み合わせにおける DPPH ラジカル消去活性を検討した. 表 3 に各試料の IC₅₀ 値を示す. 活性の強弱を安息香酸類, 桂皮酸類, フラボノイド類でみると, フェノール性水酸基の数に依存しており, これらについては明らかにされている構造活性相関¹⁰⁾と一致する. 次に得られた値を参考に, これらの組み合わせの活性に及ぼす影響について検討した. なお, pHyB と AG は本条件ではほとんど活性を示さなかった (pHyB の消去率% : 50µg/ml, 2.0% ; 100µg/ml, 3.0% ; 200µg/ml, 3.8% ; 300µg/ml, 4.7% ; 500µg/ml, 5.7%, AG の消去率% : 20µg/ml, 2.6% ; 40

µg/ml, 5.4% ; 60µg/ml, 7.3% ; 80µg/ml, 8.9% ; 100µg/ml, 12.1%) が, それぞれ 100µg/ml および 10µg/ml となるように調製し, 混合試験に供することとした. また, 図 2 と一部重なる組み合わせ (GA, Fer, QC, MO, CT, aTOC の 15 通り) については, 新たに測定することとした. 全組み合わせによる実測消去率と予測消去率を表 4 に, また混合による活性予測値に対する効果を図 3 に示す. 276 通りの組み合わせのうち, 74 通りで相乗効果, 61 通りで相殺効果が観察され, 半数は相加的であった. しかし, 表 3 と同様, 相乗および相殺効果は弱く, I_M/I_E 比が 1.2 以上を示した組み合わせは 14 通り, I_M/I_E 比が 0.8 以下を示した組み合わせは 33 通りであった. 1.2 以上の組み合わせのうち, 6 通りは aTOC との組み合わせ, 4 通りは PA との組み合わせであり, 0.8 以下の組み合わせのうち, 17 通りは VA との組み合わせ, 12 通りは pCou との組み合わせであった.

考 察

全組み合わせのうち, α-トコフェロール (aTOC) との組み合わせだけをみると, 多くの化合物と相乗効果を示し, アスコルビン酸 (AA) との組み合わせでは活性は約 1.24 倍に増強した. 一方, aTOC とフラボノイドとの組み合わせをみると, 相乗効果が認められたものはルテオリン (LT), ケンフェロール (KM), ケルセチン (QC), モリン (MO), フィセチン (FT) との組み合わせであり, その他 (アピゲニン (AP), ミリセチン (MC), ルチン (RT), タキシフォリン (TX), シアニジン (CY), ベラルゴニジン (PG), カ

表 3 使用した抗酸化物質の IC₅₀ 値

	IC ₅₀ (µg/ml)		IC ₅₀ (µg/ml)
pHyB	>500	MC	2.58±0.08
VA	12.8±0.28	RT	7.10±0.07
PA	2.14±0.01	FT	2.42±0.04
GA	1.63±0.04	TX	4.04±0.04
pCou	125±6.5	CY	2.88±0.07
Fer	6.58±0.14	PG	8.17±0.40
Caf	2.96±0.06	CT	2.57±0.02
AP	>500	AA	4.84±0.05
LT	3.60±0.07	aTOC	10.4±0.02
KM	9.09±0.03	Ros	2.84±0.01
QC	2.36±0.01	CarA	4.77±0.05
MO	6.18±0.02	Car	6.81±0.11

値は 3 回の繰り返し測定での平均値±標準偏差で表示.

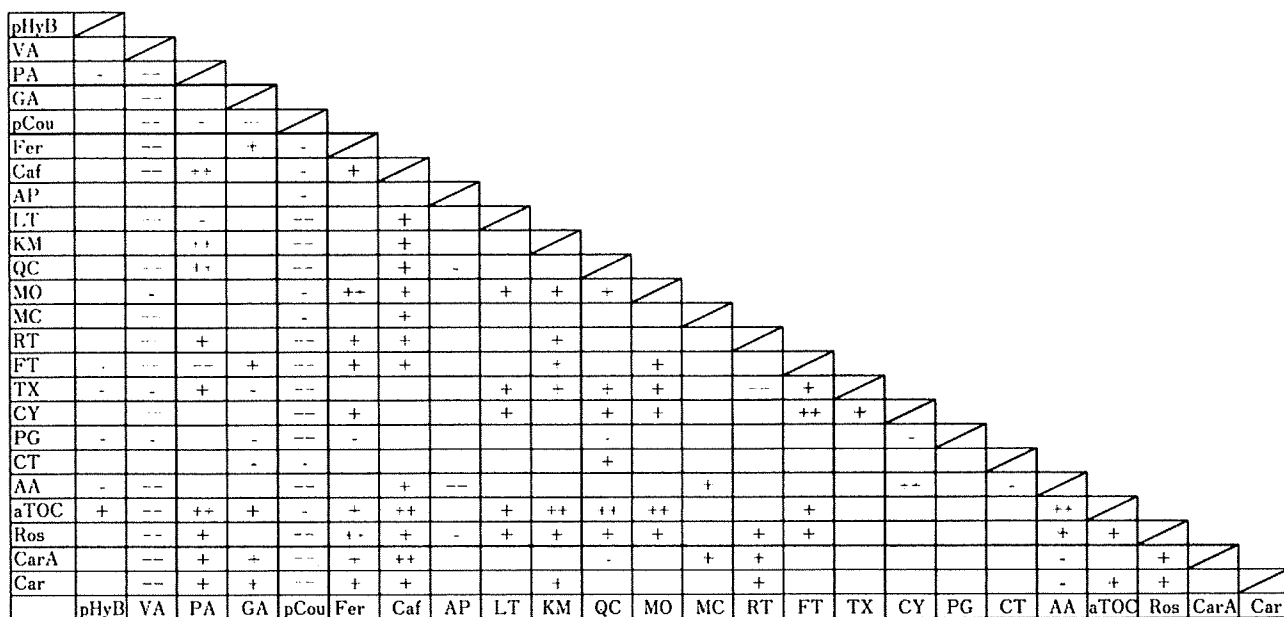


図 3 24 種の抗酸化物質の組み合わせによる DPPH ラジカル消去活性予測値に対する効果

- + : I_M/I_E の比が 1.0 以上 1.2 未満で有意差あり.
- ++ : I_M/I_E の比が 1.2 以上で有意差あり.
- : I_M/I_E の比が 0.8 以上 1.0 未満で有意差あり.
- : I_M/I_E の比が 0.8 未満で有意差あり.

表 4 抗酸化物質の 25% 消去濃度での 2 成分混合系における消去率 (I_M) と予測値 (I_E)

	pHyB		VA		PA		GA		pCou		Fer		Caf		AP		LT		KM		QC		MO			
	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E		
pHyB	—	—	33.5	35.4	18.7	20.6	27.2	25.1	30.2	29.3	21.8	21.9	26.8	23.9	0.0	0.0	18.0	17.2	29.5	28.4	26.2	27.6	23.0	21.2		
VA	—	—	—	—	30.8	50.7	34.0	53.0	40.1	54.9	34.3	49.6	30.7	52.4	36.7	32.8	35.0	45.3	33.4	52.5	36.4	47.8	37.5	46.5		
PA	—	—	—	—	—	—	—	41.8	38.8	35.2	43.9	46.5	42.2	50.7	40.7	23.6	24.9	37.0	39.3	53.0	42.8	46.4	36.4	45.4	41.6	
GA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	34.9	45.5	48.5	43.9	44.5	41.6	23.2	24.0	36.0	36.2	46.0	45.3	44.9	41.1	37.5	39.2	
pCou	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.7	44.0	38.2	45.0	29.8	31.8	31.3	41.5	35.9	51.2	39.8	51.2	35.5	44.3	
Fer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	45.7	39.6	21.5	19.8	41.8	39.7	46.8	43.5	40.1	38.5	49.2	40.4
Caf	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29.8	32.5	38.8	35.0	57.7	51.2	59.5	51.4	48.6	41.0
AP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	31.9	34.7	30.5	28.7	17.9	21.2	33.5	35.0
LT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
KM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
QC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

	MC		RT		FT		TX		CY		PG		CT		AA		aTOC		Ros		CarA		Car	
	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E
pHyB	20.6	20.2	21.7	21.5	24.1	29.0	25.0	27.9	24.8	24.2	17.4	21.7	20.2	21.9	21.7	24.7	22.0	19.3	27.3	25.8	24.1	24.4	31.0	30.8
VA	32.9	45.5	31.7	47.4	36.8	46.6	40.5	45.0	35.0	49.1	39.4	44.9	41.3	44.1	33.1	47.4	33.5	43.6	34.3	52.1	33.7	50.7	27.3	49.2
PA	40.7	37.7	45.3	40.1	20.3	39.6	61.3	55.3	46.3	45.1	40.7	41.5	42.5	40.4	48.8	44.5	51.7	40.6	59.7	51.2	60.1	50.3	59.1	49.6
GA	39.7	36.1	40.8	42.9	45.6	39.6	41.1	46.3	42.4	43.2	36.6	39.4	37.0	43.2	40.4	41.6	42.7	37.4	45.5	43.4	47.5	42.3	56.3	48.4
pCou	36.4	43.5	35.4	45.2	38.5	52.4	38.6	50.6	34.6	49.4	33.8	44.2	36.7	45.5	16.9	47.5	35.0	43.7	39.3	49.4	38.4	48.4	40.4	51.8
Fer	36.2	35.3	42.8	38.7	46.0	41.8	40.6	42.5	44.1	38.5	36.0	40.0	37.8	39.0	49.3	47.6	52.2	43.9	57.5	41.5	46.2	40.3	52.1	46.5
Caf	45.1	40.0	49.1	42.2	46.8	43.0	45.1	40.6	49.7	49.3	40.6	42.4	42.9	42.5	47.1	41.5	46.5	37.5	57.5	49.4	58.5	48.4	58.6	49.4
AP	17.4	14.7	21.2	20.7	24.1	25.5	28.8	27.8	15.6	15.6	20.8	22.0	32.0	31.7	12.5	20.6	20.1	20.7	26.2	27.9	22.1	25.7	31.1	32.6
LT	31.3	30.8	37.4	35.0	47.2	46.5	61.3	52.8	48.6	44.9	35.5	35.9	55.0	55.4	33.1	36.5	39.9	36.4	43.7	41.3	40.8	39.5	39.5	39.1
KM	36.5	35.9	45.0	41.9	50.3	43.0	46.1	41.7	51.1	49.4	43.6	41.8	44.5	48.0	44.9	45.0	51.5	41.1	53.2	46.7	49.6	45.7	59.6	50.8
QC	36.3	33.7	40.1	38.3	38.4	35.5	50.9	43.1	38.3	33.5	34.0	38.1	51.3	46.2	43.5	42.6	46.4	38.4	51.0	44.0	36.4	42.2	42.5	41.1
MO	35.4	32.9	49.6	45.3	52.5	46.8	59.9	53.1	48.8	45.1	38.0	38.5	56.7	55.6	48.2	45.3	49.7	41.4	50.1	42.5	43.0	40.8	43.3	43.8

	MC		RT		FT		TX		CY		PG		CT		AA		aTOC		Ros		CarA		Car			
	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E		
MC	—	—	35.8	33.0	34.9	32.5	37.7	35.6	28.5	30.0	33.0	35.2	37.4	36.6	43.0	38.2	38.4	34.7	33.2	31.1	39.9	34.7	36.8	40.4		
RT	—	—	—	—	38.4	36.9	17.2	34.3	41.7	38.2	37.2	38.0	36.6	36.1	36.9	39.7	43.7	39.8	47.5	41.0	45.5	39.9	48.5	44.7		
FT	—	—	—	—	—	—	46.6	40.9	39.1	30.9	36.0	36.5	45.7	44.1	35.6	39.0	45.6	39.1	46.7	42.6	43.2	40.9	45.1	42.3		
TX	—	—	—	—	—	—	—	—	45.5	39.1	38.0	38.5	41.1	40.7	38.8	42.7	49.2	42.8	44.3	41.0	40.7	39.1	44.9	43.0		
CY	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	37.6	41.4	44.5	42.4	49.4	39.8	35.2	34.6	39.2	37.1	43.4	40.6	50.1	48.1	
PG	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	36.4	37.0	39.7	42.1	38.6	37.8	48.7	46.1	39.7	38.1	42.4	
CT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.0	43.1	43.5	43.2	42.4	42.7	38.5	40.9	40.3	
AA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	43.1	34.6	56.4	47.1	36.7	40.1	42.5	47.0
aTOC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	49.0	43.1	44.4	41.3	49.8	45.0
Ros	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
CarA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

値は 3 回あるいは 6 回の繰り返し測定での平均値で表示。なお、IC₅₀ 値が得られなかった pHyB は 100 μg/ml, AP は 10 μg/ml の濃度で使用した。

テキン (CT)) とは相加的であった。また、AA とフラボノイドとの組み合わせをみると、相乗効果が認められたものは MC と CY, 相殺効果が認められたものは AP と CT であり、その他はすべて相加的であった。Murakami ら¹³⁾ は DPPH-HPLC 法を用いて aTOC あるいは AA と 15 種のフラボノイドをそれぞれ 10 μM で混合し、各活性値の和

と混合物の活性値を比較して、aTOC とフラボノイド間、AA とフラボノイド間では相加的であったことを明らかにしている。Murakami らの結果と比較するフラボノイド 5 種 (QC, KM, RT, CY, CT) 10 通りを比較すると、aTOC vs QC, aTOC vs KM, AA vs CY, AA vs CT の 4 つの組み合わせで結果が異なっていた。しかし、Murakami ら

の方法とは①同一の濃度での検討と同一の活性値 (IC₂₅)での検討, ②予測活性値の算出の違いの点で大きく異なる。著者らは, 50%の消去率同士を混ぜ合わせても100%にはならない点, 高濃度では活性値に頭打ちが認められる点, 活性が大きく異なる試料同士では濃度を統一することができない点から, 混合系の評価の判定に式(2)を用いた。ただ, 混合系での効果の判定は, 他にも解析方法がいくつか報告^{17)~19)}されており, 今後他の解析方法による判断が必要であろう。

SaitoとKawabata²⁰⁾はプロトカテック酸およびその類縁体とチオール類またはアミン類との相乗効果を明らかにし, プロトカテック酸のカテコール構造の再生が関与していることを報告している。本研究では, チオール類およびアミン類は使用していない。カテコール構造の有無から判断すると, 安息香酸類, 桂皮酸類, KM, QC, MOおよびCY, PGなどの比較は何らかの情報を与えてくれると考えられるが, カテコール構造の有無による影響を述べるには更なる検討が必要であろう。すなわち, 単一の化合物の活性評価においては, 理に適った構造活性相関が観察されているにも関わらず, 2成分間の混合効果を比較するとあまり構造には基づいておらず, この点からも, 複数の解析による判断が必要であることが推察される。

本結果から組み合わせの約半数は相加的であり, また相乗効果および相殺効果が認められた組み合わせにおいても, その多くは相加効果をわずかに上回る, あるいは下回る程度であることが明らかとなった。須田ら²¹⁾は66種類の果実・野菜の抽出液のDPPHラジカル消去活性とポリフェノール含量を測定し, 可食部あるいは未利用部のアセトンと80%エタノール抽出液の活性総和と含量の間に, 相関係数としてそれぞれ0.947あるいは0.964と高い相関を有していることを明らかにしている。活性と含量の間における高い相関は, 抗酸化物質間に起きる効果の打ち消し, あるいは効果を検知しないことを示唆する。Murakamiら¹³⁾はリポソーム酸化系では相乗効果を示した組み合わせでもDPPH-HPLC法では相加的な抗酸化性を示すことを報告している。今回の我々の結果やこれらの報告を考慮すると, DPPHラジカル消去活性測定法は抗酸化物質間に起こる効果を検知しにくいかもしれない。今後, 濃度依存性も含めて更なる検討が必要であろう。

要 約

DPPHラジカル消去活性測定法を用いて, 2成分間の活性に及ぼす効果(相乗効果, 相加効果, 相殺効果)について検討した。11種の酸化防止剤55通りの組み合わせでは, 36通りにおいて統計上相乗効果, 1通りで相殺効果と判定される結果が得られた。一方, 24種の化合物276通りの組み合わせ(うち15通りは重複)では, 74通りにおいて相乗効果, 61通りで相殺効果が得られた。しかし, これらの多

くの組み合わせによる効果は弱く, 相加効果をわずかに上回る, あるいは下回る程度であり, 2割以上の活性増強が認められた組み合わせは14通り, 2割以下の活性低下が認められた組み合わせは33通りであった。一方, α -トコフェロールとの組み合わせのうち6通りで, *p*-クマル酸との組み合わせのうち4通りで2割以上の活性増強が観察され, バニリン酸との組み合わせのうち17通りで, *p*-クマル酸との組み合わせのうち12通りで2割以下の活性低下が観察された。

本研究の一部は, 平成18年度, 平成19年度厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)により行われた。

文 献

- 1) 食品・食品添加物等規格基準(抄), 食衛誌, 49, J119-J156 (2008).
- 2) Tada, A., Jin, Z.-L., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T. and Tanamoto, K., Analysis of the constituents in Jojoba wax used as a food additive by LC/MS/MS. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 198-204 (2005).
- 3) Sugimoto, N., Noike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T. and Tanamoto, K., Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Add. Contam.*, 24, 799-806 (2007).
- 4) 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, 食科工, 54, 482-487 (2007).
- 5) Plumb, G.W., Lambert, N., Chambers, S.J., Wanigatunga, S., Heaney, R.K., Plumb, J.A., Aruoma, O.I., Halliwell, B., Miller, N.J. and Williamson, G., Are the extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetable antioxidants? *Free Rad. Res.*, 25, 75-86 (1996).
- 6) Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I. and Lajolo, F.M., Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2928-2935 (2005).
- 7) Dasgupta, N. and De, B., Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chem.*, 101, 471-474 (2007).
- 8) Packer, J.E., Slater, T.F. and Willson, R.L., Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278, 737-738 (1979).
- 9) Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. and Gotoh, N., Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.*, 6, 1322S-1326S (1995).
- 10) Hamilton, I.M.J., Gilmore, W.S., Benzie, I.F.F., Mulholland, C.W. and Strain, J.J., Interactions between vitamins C and E in human subjects. *Br. J. Nutr.*, 84, 261-267 (2000).
- 11) Pekkarinen, S.S., Heinonen, I.M. and Hopia, A.I., Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *J. Sci. Food. Agric.*, 79, 499-506 (1999).
- 12) Hiramoto, K., Miura, Y., Ohnuki, G., Kato, T. and Kikugawa, K., Are water-soluble natural antioxidants syn-

- ergistic in combination with α -tocopherol? *J. Oleo. Sci.*, **51**, 569-576 (2002).
- 13) Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H. and Matoba, T., Effects of ascorbic acid and α -tocopherol on antioxidant activity of polyphenolic compounds. *J. Food Sci.*, **68**, 1622-1625 (2003).
- 14) Webb, J.L., Effect of more than one inhibitor. In "Enzyme and metabolic Inhibitors," Vol. 1, (Academic press, New York), pp. 66-79, 488-512 (1963).
- 15) Shi, J., Qu, Q., Kakuda, Y., Xue, S. J., Jiang, Y., Koide, S. and Shim, Y. -Y., Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. *J. Food Comp. Anal.*, **20**, 603-608 (2007).
- 16) Rice-Evans, C., Miller, N.J. and Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biol. Med.*, **20**, 933-956 (1996).
- 17) Chou, T.C. and Talalay, P., Quantitative analysis of dose-effect relationships : the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 27-55 (1984).
- 18) Berenbaum M.C. (1985) The expected effect of a combination of agents : The general solution. *J. Theor. Biol.*, **114**, 413-431 (1985).
- 19) Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M. and Perry, E.K., Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacol. Biochem. Behavior*, **75**, 661-668 (2003).
- 20) Saito, S. and Kawabata, J., Synergistic effects of thiols and amines on antiradical efficiency of protocatechuic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 8163-8168 (2004).
- 21) 須田郁夫, 沖 智之, 西場洋一, 増田真美, 小林美緒, 永井沙樹, 比屋根理恵, 宮重俊一, 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性, *食科工*, **52**, 462-471 (2005).
- (平成 20 年 8 月 20 日受付, 平成 20 年 12 月 3 日受理)