

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

既存添加物の有効性と品質を確保するための
規格試験法の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

分冊 その 1

研究代表者	山崎 壮	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	受田 浩之	高知大学
	松井 利郎	九州大学大学院
	石川 洋哉	福岡女子大学
	松藤 寛	日本大学
	堀江 正一	大妻女子大学
	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所
	水上 元	名古屋市立大学大学院
	多田 敦子	国立医薬品食品衛生研究所
	秋山 卓美	国立医薬品食品衛生研究所

平成 23 年 (2011 年) 5 月

目次

分冊 その1

I. 総括研究報告書

- 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…………… 1
研究代表者：山崎 壮

II. 分担研究報告書

A. 有効性を担保できる既存添加物の品質評価試験法の開発

1. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究
- 1.1. 酸化防止剤力価評価における DPPH 法の室間共同研究…………… 11
研究分担者：受田 浩之
研究分担者：松井 利郎
研究分担者：石川 洋哉
研究協力者：島村 智子
研究協力者：柏木 丈広
- 1.2. ロダン鉄法による酸化防止剤の力価評価及び他の抗酸化活性評価法との関連…………… 23
研究分担者：受田 浩之
研究協力者：松井 利郎
研究協力者：石川 洋哉
研究協力者：島村 智子
研究協力者：柏木 丈広
- 1.3. 抗酸化活性測定法の既存添加物の有効性評価への応用に関する研究天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究…………… 31
研究分担者：松井 利郎
研究協力者：受田 浩之
研究協力者：石川 洋哉
- 1.4. 天然酸化防止剤の併用効果の解析法に関する研究…………… 39
研究分担者：石川 洋哉
研究協力者：松井 利郎
研究協力者：受田 浩之
2. 天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究…………… 49
研究分担者：松藤 寛
3. 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究…………… 61
研究分担者：堀江 正一
研究協力者：渡邊 美佳

B. 定量 NMR 法を利用した既存添加物分析法の開発

4. NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発と応用に関する研究
- 4.1. NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発に関する研究
- qNMR 多変量解析によるカラメル色素に関する研究 - 67
研究分担者：杉本 直樹
研究協力者：田原 麻衣子
研究協力者：多田 敦子
- 4.2. 定量 NMR 法による既存添加物の定量に関する研究
- qNMR によるステビオシドおよびレバウジオシド A 標準品の
純度測定法の検討 - 85
研究分担者：多田 敦子
研究協力者：杉本 直樹
研究協力者：石附 京子
- 4.3. 定量 NMR 法の既存添加物と天然抽出物への適用に関する研究 93
研究分担者：水上 元
研究協力者：永津 明人

C. 既存添加物の基原確認試験法の開発

5. 既存添加物の成分と基原に関する研究
- 既存添加物トウガラシ水性抽出物の品質・基原に関与する成分の分析 - 99
研究分担者：多田 敦子
研究協力者：石附 京子
6. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究 107
研究分担者：秋山 卓美

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 別冊
研究協力者：日本食品添加物協会
分冊その 2 に記載

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 119

IV. 研究成果の刊行物・別刷 121

分冊 その 2 (別冊)

既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究
日本食品添加物協会

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

研究代表者 山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部第二室長

研究要旨

既存添加物の成分規格の整備が大幅に遅れている。しかも成分規格未設定品目には、有効成分が多く類似化合物の混合物であると考えられている品目や、有効性と有効成分自体が明確でない品目が多い。本研究では、これまでの既存添加物成分規格では対応が不十分であった有効性評価と基原の確認に対応するために、(1)有効性を担保できる品質評価試験法の作成、(2)混合物の確認能力にすぐれた GC/MS、LC/MS、NMR を利用した規格試験法の開発、(3)基原の確認試験法の開発、をめざしている。3年計画の3年目は、以下の研究を行った。

有効性を担保できる品質評価試験法の開発としては、成分規格試験法に利用できる抗酸化活性試験標準操作法を確立するために、DPPH 法のプロトコールを詳細に再検証した上で、14 機関による DPPH 法の室間共同試験を実施して標準操作法を確立した。代表的な脂質酸化抑制能評価法であるロダン鉄法の操作法を改良し、酸化防止剤の力価評価を行った。ORAC 法を用いて酸化防止剤の併用効果の解析を行った。DPPH 法を用いて併用効果発現因子の解明を試みた結果、ラジカル消去速度が併用効果を生じる一因になっていることが示唆された。また、天然抗酸化剤の酸化による品質劣化のハザード評価指標成分を探索するためにローズマリー抽出物を強制的に加熱処理して劣化させると遺伝毒性物質が生成することが明らかになったので、遺伝毒性物質を探索した結果、加熱処理により顕著に生成した化合物のうちのデヒドロロスマリキノンに遺伝毒性を認めた。保存料・日持ち向上剤の有効性評価試験法の開発としては、ホコッシ抽出物の抗菌活性成分がバクチオールであることを確認し、製品中のバクチオールを定量した。

新技術を導入した規格試験法の開発としては、定量 NMR 法を用いて「カラメル」と「ステビア抽出物」の規格試験に使用する定量用試薬の SI トレーサブルな絶対純度を測定した。「ベニバナ赤色素」に含まれる主色素成分カルタミンを、定量 NMR 法を用いて定量した。定量 NMR 法と多変量解析を組み合わせた方法でカラメル製品の区別分類と原材料の特定が可能であるか検討した結果、製品の原材料を推定する有力な手法になり得ることが示唆された。

基原の確認試験法の開発としては、既存添加物「トウガラシ水性抽出物」の含有成分の分析方法を検討し、この方法を用いて製品の基原を考察した。昨年度までに酵素製品中の含有タンパク質の電気泳動パターンが酵素の簡便な基原確認試験法として有効な手段であることを明らかにしたが、*Bacillus* 属のように属の確認しかできない試料もあった。そこで、今年度は α -アミラーゼをモデルにしてタンパク質分解酵素で消化し、生成するペプチドを HPLC で分析した結果、ペプチド分析により菌株の異なる酵素製品の識別に有用な情報が得られる可能性が示唆された。

このほかに、食品添加物業界に依頼し、第 9 版食品添加物公定書新規収載候補品目の自主規格の改善検討と新規収載規格原案作成および成分規格案の設定根拠資料の整備を行った。

研究分担者	
受田 浩之	高知大学教育研究部自然科学系生命環境医学部門 教授
松井 利郎	九州大学大学院農学研究院 准教授
石川 洋哉	福岡女子大学人間環境学部 准教授
松藤 寛	日本大学生物資源科学部 准教授
堀江正一	大妻女子大学家政学部 教授
水上 元	名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授
杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第三室長
多田 敦子	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官
秋山 卓美	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官
研究協力者	
島村 智子	高知大学教育研究部自然科学系生命環境医学部門 准教授
柏木 丈拵	高知大学教育研究部自然科学系生命環境医学部門 准教授
渡邊 美佳	大妻女子大学家政学部
田原 麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
永津 明人	金城学院大学薬学部 教授
石附 京子	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部
白須 由治	日本食品添加物協会 常務理事

A. 研究目的

既存添加物 418 品目のうち、国の成分規格設定済は 130 品目にとどまっている。成分規格未設定品目には、有効成分が多く類似化合物の混合物であると考えられている品目や、有効性と有効成分自体が明確でない品目が多い。また、成分の有効性と安全性の確保には正しい基原の原材料を使用することが重要であり、それを担保する規定も整備する必要がある。

これまでの既存添加物成分規格では添加物としての有効性評価が軽視されてきた。そこで我々は、以前の厚生労働科学研究において、酸化防止剤、苦味料、増粘安定剤、ガムベースに重点を置き、有効性（活性）を測定する手法も導入して品質評価の指標となる成分を明らかにしてきた。本研究ではその考えをさらに進める。分析法の開発に当たっては、混合物の確認能力にすぐれた GC/MS、LC/MS、NMR を利用した規格試験法の開発を行う。さらに、これまで我々が取り上げなかった保存料・日持ち向上剤の成分解析と、基原の確認試験法の開発を重点事項に加える。

B. 研究方法（3年間の全体計画）

A. 有効性を担保できる既存添加物の品質評価試験法の開発

- 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究
 - 成分規格試験法に利用できる、室間再現性のある抗酸化活性測定標準操作法の確立をめざした。
 - 異なる抗酸化活性測定法の測定値間の関連性を評価した。
 - 酸化防止剤の併用が活性測定値に与える影響を検討した。
- 天然抗酸化剤の品質劣化と過剰使用に

よる有害物質生成の可能性の検討

酸化防止剤を高濃度で強制的に酸化劣化させた際の有害物質生成の可能性を、*in vitro* 遺伝毒性を指標にして調べた。有害物質の生成条件および遺伝毒性成分を解析した。

3. 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究

既存添加物の保存料・日持ち向上剤製品の抗菌・抗かび活性をスクリーニングした（1～2年目）。活性が認められた品目について抗菌・抗かび活性成分の解析を行った（2～3年目）。

B. 定量 NMR 法を利用した既存添加物分析法の開発

4. 定量 NMR 法は、測定対象成分の標準物質がなくても試料中の個別成分含量を絶対定量できるという特長をもつ。年度ごとに品目を変えて、既存添加物への適用性を検証した。

C. 既存添加物の基原確認試験法の開発

5. 既存添加物の成分と基原に関する研究

植物由来添加物の成分と原料植物中の成分とを比較しながら、市販製品の基原の妥当性を考察した。年度ごとに品目を変えて実施した。

6. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発

酵素製品中の酵素タンパク質を確認する簡便な方法として、タンパク質電気泳動（1～2年目）とペプチド分析（3年目）を検討した。

D. 既存添加物の業界自主規格の整備

7. 既存添加物の業界自主規格の作成と改良を業界に依頼した。

E. 倫理面への配慮

本研究においては、実験動物、ヒトを対象とした研究およびヒトから採取した臓器・組織などの試料を用いる研究は実施しなかつ

た。分担研究課題の一つでヒト由来細胞株としてヒトリンパ芽球培養細胞株 TK6 を使用したが、ATCC からの分譲では biosafety level 1 とされており、研究倫理および安全性上の国の指針の対象に該当しない。その取り扱いに関しても、研究分担者の所属機関での培養細胞の取り扱い規程に従った。

C. 研究結果および考察

[] 内の番号は、該当する分担研究報告書の目次番号を示す。

A. 有効性を担保できる既存添加物の品質評価試験法の開発

1. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

1) 酸化防止剤力価試験法としての DPPH 法の室間共同試験 [1.1]

DPPH ラジカル消去活性測定のプロトコール（以下 DPPH 法）を詳細に再検証し、改良した。天然物由来酸化防止剤 4 種類（エンジュ抽出物、チャ抽出物、ブドウ種子抽出物、*d-α*-トコフェロール）と抗酸化活性標準物質であるトロロックスを試料として、14 機関が参加して DPPH 法の室間共同試験を実施してプロトコールの妥当性を検証した。共同試験結果の解析では、各試験室から報告された吸光度、または IC₅₀ の値を使用し、外れ値検定を行った後、室内再現相対標準偏差 (RSD_r) と室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を求め、最終的に RSD_R/RSD_r (RSD 比) を求めた。IC₅₀ を解析指標に用いた場合、RSD 比は 1.30～3.44 であった。エンジュ抽出物とトロロックスで RSD 比 ≤ 2 の基準を満たした。*d-α*-トコフェロールは、RSD 比 = 2.16 となったものの、比較的室間再現性は高かったと判断した。チャ抽出物とブドウ種子抽出物の RSD 比は 3.44、2.72 となり、2 を超えたが、その原因のひとつとして、試料の保管中や秤量中の吸湿による採取量の誤

差が生じ、室間再現性を低くした可能性が推察された。吸湿しやすい試料の取扱いについては今後の検討課題である。

また、ORAC法の室間共同試験結果が報告されているが、そのRSD比は2.35~4.99である。DPPH法の室間再現性がORAC法よりも高いことが示された。

以上の結果、標準物質のトロロックスと酸化防止剤のエンジュ抽出物に関しては高い室間再現性を確認できたことから、基本的なDPPHラジカル消去活性測定プロトコルの妥当性は本試験において確認できたものと判断した。

2) ロダン鉄法による酸化防止剤の力価評価 [1.2]

抗酸化活性測定法として、今年度は代表的な脂質酸化抑制能評価法であるロダン鉄法を検討した。リノール酸反応溶液の調製方法、各種試薬の濃度、反応時間の改良を行い、35種類の酸化防止剤の力価評価を行った。改良ロダン鉄法が広い適用範囲を有することが判明した。しかし、操作の煩雑さ、測定時間の長さ、再現性の低さなどの問題から公定試験法には不適切であると考えられた。そこで、ロダン鉄法の結果を最も反映し得る酸化防止剤の力価評価法を選択した結果、DPPH法が最も適していた。

3) 天然酸化防止剤の併用効果とその作用機構の検討

酸化防止剤の併用が活性測定値に与える影響を検討するために、天然酸化防止剤の併用効果を検討した。

3-1) ORAC法での併用効果 [1.3]

ORAC法を用いて7通りの組合せで併用性評価を試みた。データはMedian effect analysisで解析した。相乗効果を示したのが2組、相加効果を示したのが1組、濃度

によって相乗/相加効果を示したのが4組であった。DPPH法を用いた時の併用効果の解析結果とは異なる結果であった。ORAC法とDPPH法では反応機構が異なることに起因すると推測される。

3-2) DPPH法での併用効果発現因子の解明 [1.3, 1.4]

DPPH法を用いて併用効果発現因子の解明を試みた。DPPHラジカル消去の初速度（反応開始時点の反応速度）を指標にした検討と、反応がほぼ平衡に達した時のDPPHラジカル消去量（反応がほぼ終点に達するまでの全体的な反応速度を反映する。）を指標とした検討を行った。データは、共にMedian effect analysisで解析した。2つの検討は独立して実施され、検討した抗酸化剤の組合せが同一ではないため、結果を単純に比較して考察することができないが、概ね以下のことが示唆された。まず、ラジカル消去速度が併用効果を生じる一因になっていることが示唆された。また、どちらの数値を指標とした場合でも、抗酸化物質のラジカル消去速度が速い物質どうしの組合せは相乗性を示した。一方、ラジカル消去速度が中程度または遅い物質を含む組合せの場合には、反応初速度を指標とした場合と反応終点の反応量を指標とした場合とでは、併用効果（相乗、相加、相殺）は異なった。解析に用いる指標はさらに検討が必要である。

抗酸化剤の併用効果の作用機構に関しては不明な点が多く、まだまだ検討すべきことが多く残っている。

2. 天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究 [2]

天然酸化防止剤の過剰使用や劣化による有害物質生成の可能性を調べて生

成する有害物質を特定することは、その食品のハザードマーカーになるとの観点から、*in vitro* 遺伝毒性を用いて有害物質生成の可能性について検討した。

1) ローズマリー抽出物の加熱処理

昨年度の検討で、ローズマリー抽出物を強制的に加熱処理して劣化させると遺伝毒性物質が生成することが明らかになったので、今年度は遺伝毒性物質の特定を試みた。

ローズマリー抽出物の加熱処理により顕著に生成した5つの化合物のうち、3つをデヒドロスマリキノン、デヒドロスマリパラキノン、デヒドロネオクリプトタンシノンと同定した。この3化合物のうちのデヒドロスマリキノンは、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた遺伝毒性試験において、0~2 g/ml の範囲で濃度依存的に小核誘発を示し、遺伝毒性を示した。コーン油中にローズマリー抽出物を高濃度に添加して 150 °C で加熱すると、加熱時間の増加に伴い、デヒドロスマリキノンの生成量は増大した。

2) ブドウ種子抽出物の加熱処理

ブドウ種子抽出物を加熱処理し、生成する分解物の特定と加熱分解物の遺伝毒性についても検討した。ブドウ種子抽出物の成分はプロアントシアニジンと少量のカテキン類であるが、加熱時間の増加に伴い、プロアントシアニジン類、カテキン類のピークは減少し、分解物のピークが検出された。未処理ブドウ種子抽出物並びにその加熱分解物には遺伝毒性は認められなかった。

3. 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究 [3]

昨年度までの検討で抗菌活性が認めら

れたホコッシ抽出物について、その抗菌活性成分を明らかにすることを目的とした。

ホコッシ抽出物を Oasis HLB カートリッジに負荷し、カートリッジに保持された成分と流出された成分に分画した。この分画液を微生物学的試験法に供したところ、カートリッジに保持された疎水性分画液側に抗菌性があることがわかった。疎水性分画液を HPLC および LC-MS/MS に供し、本分画液に含まれる主な成分を同定したところ、主成分はバクチオールであった。

ホコッシ抽出物希釈液（1000 倍希釈）中に含まれるバクチオール含量を、HPLC 法と抗菌活性を指標とした微生物学的試験法により求めた結果、近似した値（HPLC 法：約 330 μ g/mL、微生物学的試験法：約 250 μ g/mL）が得られた。以上のことから、バクチオールがホコッシ抽出物中の主な抗菌活性成分であると推定した。

B. 定量 NMR 法を利用した既存添加物分析法の開発

4. NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発と応用に関する研究

定量 NMR 測定では、

- (a) 個別試料ごとに定量測定に適したプロトンシグナルを選択すること。
- (b) 個別試料ごとに、定量 NMR 測定濃度領域における定量精度を確認すること。
- (c) 純度が保証された SI 単位系にトレーサブルな定量 NMR 基準物質（定量 NMR の内標準物質）を確保すること。
- (d) 測定対象化合物量に対してプロトンシグナル面積が精確な定量性をもつ NMR 測定条件を設定すること。
- (e) NMR 観測データから精確なピーク面積を算出できるデータ解析ソフトウ

ェアを開発すること。
が重要ポイントである。この研究班では定量 NMR の応用研究にターゲットを絞り、個別試料ごとの対応が必要な事項(a)と(b)について検討した。事項(c)～(e)は定量 NMR 法の基本技術に関わる問題であり、測定対象有機化合物の種類に関わらない共通事項であるが、別の研究プロジェクトの中で検討した成果を利用した。

1) 定量用試薬の純度測定 [4.1、4.2]

- ・ 2-methylimidazole (2-MeI) 試薬、4-methylimidazole (4-MeI) 試薬および 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-imidazole (THI) 試薬 (食品添加物「カラメル」の純度試験に用いる定量用標準物質)
- ・ ステビオシド試薬およびレバウジオシド A 試薬 (食品添加物「ステビア抽出物」の定量用標準物質)

の SI トレーサブルな絶対純度を測定した。その結果は以下の様であった。

- ・ THI 試薬の 3 試料の純度：93～96%
- ・ 2-MeI の 1 製品の純度：98%
- ・ 4-MeI の 1 製品の純度：93%
- ・ ステビオシド試薬の 5 製品の純度：92～98%
- ・ レバウジオシド A 試薬の 5 製品の純度：95～97%

製品によって純度に違いが認められた。また、市販試薬には GC または HPLC によるピーク面積百分率法、あるいは滴定法により求めた純度が記載されていたが、一部の試薬では記載値と比べて定量 NMR 測定純度値が低かった。定量用標準品には、SI トレーサビリティを確保した絶対純度の規定が必要であると考えられる。

2) 食品添加物製品中の指標成分の定量 [4.3]

既存添加物「ベニバナ赤色素」に含まれ

る主色素成分 carthamin を、SI トレーサビリティを確保して絶対定量した。「ベニバナ赤色素」製品の一部に、定量 NMR 用基準物質 1,4-bis(trimethylsilyl)benzene (BTMSB) のシグナルと重なる製品があったことから、NMR 基準物質には、認証標準物質である bisphenol A で濃度校正した hexamethyldisilane (HMD) を用いた。入手した 5 種類の製品の carthamin 含量は 0.17～6.59% であった。色価のわかっている 3 つの製品では、各製品の carthamin 含量は製品の色価とおおむね一致していた。

なお、最近になって市販された定量 NMR 用基準物質 BTMSB は認証標準物質による濃度の補正が必要でないために便利であるが、今回の例で示されたように試料由来のシグナルと重なる場合があり、その使用には注意が必要である。

3) 定量 NMR 多変量解析の応用 [4.1]

カラメルは、製法の違いから I～IV に分類されるが、色素成分が不明であることもあり、市場流通製品を I～IV に区別し、さらに各製品の原材料を特定することは容易ではない。そこで、定量 NMR 法と多変量解析を組み合わせ、カラメル製品の区別分類と原材料の特定が可能であるか検討した。カラメル I 9 製品、カラメル III 4 製品、カラメル IV 7 製品を対象にした。

すべての試料において δ 3.0～5.5 ppm の領域に糖類に由来するシグナルが観察されると共に、高磁場 δ 1.0～3.0 ppm および低磁場 δ 6.0～10 ppm の領域に試料ごとに特徴的なシグナルが観察された。また、試料ごとに NMR スペクトル上に観察されるシグナルが若干異なり、製造方法、原料、性状に起因しているものと考えられた。そこで、NMR スペクトルの多変量解析を行った。糖蜜および砂糖を原材料とするもの

は明らかに異なるグループを形成した。また、グルコースまたは砂糖を原材料としたものは若干異なるグループを形成した。これらのグループ形成に関わる寄与成分について今後精査することによって、カラメル I、III および IV、また、原材料を特定するための指標成分を設定可能であると考えられた。

また、定量 NMR では、今回入手したカラメル製品のすべてから THI が検出されなかった。

C. 既存添加物の基原確認試験法の開発

5. 既存添加物の成分と基原に関する研究

既存添加物トウガラシ水性抽出物の品質・基原に関与する成分を明らかにすることを目的として、HPLC および LC-MS によるトウガラシ水性抽出物の含有成分の分析方法を検討した。この方法を用いて既存添加物「トウガラシ水性抽出物」3 製品を分析したところ、成分含量に多少の違いは見られたものの、成分組成はほぼ同じであった。既報のトウガラシ由来抗菌活性成分と推定されるサポニン類のピークを含有することが確認され、また、既報との成分検出パターンの類似から、今回分析した製品の基原が既報の基原と同様であると推測された。

6. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究

日本では食品用酵素は、酵素機能を表し、酵素タンパク質を特定できる名称ではない。そのため、ほとんどの酵素では、一つの品目に異なる基原に由来する製品が含まれている。そこで、昨年度までに、酵素製品中の含有タンパク質の電気泳動パターンが酵素の簡便な基原確認試験法として有効な手段であ

ることを明らかにした。しかし、*Bacillus* 属のように属の確認しかできない試料もあった。そこで、試料をタンパク質分解酵素で消化し、生成するペプチドを HPLC で分析することで識別できないか検討した。 α -アミラーゼについて、5 種類のタンパク質分解酵素で消化を行い、反応液を逆相 HPLC で分離したところ、trypsin で分解した場合と endoproteinase Lys-C で分解した場合に分解産物であるペプチドのピークが確認された。Trypsin 分解では、*Bacillus* 属由来とされ、SDS-PAGE 上で区別できないメインバンドを持つ 9 製品を明確に 3 つのグループに分けることができ、さらに SDS-PAGE の情報と併用することで 4 つのグループに分類することができた。また、Lys-C による分解を施したところ、*A. oryzae* 由来とされ、SDS-PAGE では区別できなかった 5 製品を 2 つのグループに分けることが可能であった。

Bacillus 属は同属内の菌が分類学上近縁であるとされており、それらを基原とする α -アミラーゼの分子量が類似していることはあり得るので、*Bacillus* 属内の同属異種の菌株由来の酵素を SDS-PAGE で相互区別することは困難であった。今回の検討から、ペプチド分析により菌株の異なる酵素製品の識別に有用な情報が得られる可能性が示唆された。

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

食品添加物業界（日本食品添加物協会）に依頼し、第 9 版食品添加物公定書新規収載候補品目を中心にして、これまでに策定した自主規格の改善検討と新規収載規格原案作成および成分規格案の設定根拠資料の整備を

行った。なお、第4版既存添加物自主規格（日本食品添加物協会、平成20年刊行）に記載されている品目から選定した第9版食品添加物公定書新規収載候補品目の一部については、平成21年度に「食品・添加物等規格基準に関する試験検査等」により国立医薬品食品衛生研究所で実施された自主規格の実験的検証を実施しているので、その結果も踏まえて自主規格の改善検討を行った。

また、近年の国際整合化を考慮して、既存添加物に関する海外規格との比較を実施した。すなわち米国、EUを中心として、米国FDA、EU規格、JECF規格と日本の既存添加物規格を比較できる資料を作成するために、国内と海外における分類・規格の比較表を作成した。既存添加物に関しては海外において食品扱いの品目もあるため、国際的な分類にも留意した。

D. 結論

3年計画の各プロジェクトがほぼ予定通り研究が進み、成果を得ることができた。また、研究成果を学会および学術誌に発表することもできた。

本研究班の定量NMR研究の波及効果として、定量NMR法が食品添加物の定量用標準物質（試薬）の純度測定法に採用された。さらには定量NMR法で純度測定した、国際単位系にトレーサブルな試薬が市販されるまでになった。

第9版食品添加物公定書新規収載規格原案作成および成分規格案の設定根拠資料の整備を進めた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 石川洋哉. 抗酸化食品成分の成分間相互作用の解析 ～相乗・相殺効果をどのように判定するか～. フードリサーチ 9月号、50-53, 2010. [総説]
- 2) 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, 田原麻衣子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 河村葉子, 西村哲治: 定量NMRを用いたダッタンソバ乾麺中のクエルセチンの迅速定量. 日本食品化学学会誌, 17(3), 179-184 (2010).
- 3) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀: 定量NMRを用いた有機化合物の絶対定量法の開発と食品分析の信頼性の確保. FFI ジャーナル, 215 (2), 129-136 (2010). [総説]
- 4) 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 石附京子, 西村哲治, 山崎 壮, 河村葉子: 定量NMRに基づく既存添加物中のクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量. 食品衛生学雑誌, 51(5), 205-212 (2010).
- 5) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.: Application of $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy to validation of berberine alkaloid reagents and to chemical evaluation of *Coptidis Rhizoma*, *Journal of Natural Medicines*, 64, 262-267 (2011).
- 6) 石附京子, 多田敦子, 杉本直樹, 松本清, 受田浩之, 松藤 寛, 山崎 壮, 河村葉子. 既存添加物ドクダミ抽出物の品質評価. 日本食品化学学会誌, 17(3), 192-197 (2010).

- 7) 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(2), 88-95 (2010).
2. 学会発表
- 1) 隅倉功大、山崎壮、柏木丈弘、島村智子、受田浩之: 酸化防止剤の抗酸化活性評価に対する ORAC 法の適用性について. 日本食品科学工学会第 57 回大会, 2010 年 9 月 (東京).
- 2) 隅倉功大、吉田鉄平、島村智子、柏木丈弘、山崎壮、受田浩之: ロダン鉄法による酸化防止剤の脂質酸化抑制能の評価. 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 (京都).
- 3) 松藤寛、丸山千明、高橋明日香、千野誠、山形一雄、山崎壮: 高濃度ローズマリー抽出物の加熱により生成する分解物と遺伝毒性. 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会, 2011 年 5 月 [発表予定].
- 4) 大槻崇、杉本直樹、多田敦子、建部千絵、末松孝子、有福和紀、山崎壮、佐藤恭子、西村哲治、河村葉子: 食品添加物の定量における qNMR 法の適用について. 日本薬学会第 130 年会 (2010.3).
- 5) 三浦亨、齋藤剛、井原俊英、前田恒昭、杉本直樹、多田敦子、山崎壮、西村哲治、有福和紀、末松孝子、山田裕子、吉田雄一、小池亮、堀之内嵩暁: NMR を用いた定量分析における試料調製の重要性. 第 77 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会 (2010.5).
- 6) 井原俊英、齋藤剛、清水由隆、前田恒昭、千葉光一、杉本直樹、多田敦子、山崎壮、西村哲治、末松孝子、有福和紀、山田裕子、吉田雄一、小池亮、堀之内嵩暁: 一対多型校正技術の開発. 第 71 回分析化学討論会 (2010.5).
- 7) 杉本直樹、田原麻衣子、多田敦子、久保田領志、清水久美子、山崎 壮、河村葉子、合田幸広、西村哲治: qNMR に基づく有機化合物の微量分析の検討. 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11).
- 8) Sugimoto, N., Tahara, M., Kubota, R., Shimizu, K., Hayakawa, K., Nishimura, T.: Development of a novel quantitative GC/MS using multidimensional property database. Pacifichem 2010 (2010.12).
- 9) 河野桂子、吉田貴光、杉本直樹、山崎壮、西村哲治、永津明人、水上元: qHNMR 法による「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量. 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会, 2011 年 5 月 [発表予定].
- 10) 多田敦子、高橋加奈、杉本直樹、石附京子、末松孝子、有福和紀、西村哲治、山崎 壮、河村葉子: ステビオシドおよびレバウジシド A 標準品の NMR による純度測定法の検討. 第 100 回日本食品衛生学会学術講演会, 2010 年 9 月 (熊本).
- 11) 多田敦子、石附京子、岩村淳一、三上博久、平尾美子、岡順子、楠本美紀、山名未早希、藤田功、山崎壮、河村葉子: ステビオール配糖体 9 種の分析法の検討. 第 100 回日本食品衛生学会学術講演会, 2010 年 9 月 (熊本).
- 12) 伊藤裕才、大井理江、山崎壮、河村葉子: 既存添加物チャ抽出物中のカテキン類定量法の検討. 第 100 回日本食品衛生学会学術講演会, 2010 年 9 月 (熊本).
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**
なし

A. 有効性を担保できる既存添加物の品質評価試験法の開発

1. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究
2. 天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究
3. 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究

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 22 年度分担研究報告書

酸化防止剤力価評価における DPPH 法の室間共同試験

研究分担者 受田 浩之 高知大学教育研究部総合科学系生命環境医学部門 教授
研究分担者 松井 利郎 九州大学大学院農学研究院 准教授
研究分担者 石川 洋哉 福岡女子大学人間環境学部 准教授
研究協力者 島村 智子 高知大学教育研究部総合科学系生命環境医学部門 准教授
研究協力者 柏木 丈弘 高知大学教育研究部総合科学系生命環境医学部門 准教授

研究要旨

既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価に対する公定法の設定を目的とし、DPPH 法の室間共同試験による妥当性確認を試みた。室間共同試験には 14 試験室が参加し、天然物由来酸化防止剤 4 種類と標準物質であるトロロックスを試料として DPPH 法による測定を行った。共同試験結果の解析では、各試験室から報告された吸光度、または IC_{50} の値を使用し、外れ値検定を行った後、室内再現相対標準偏差 (RSD_I) と室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を求め、最終的に RSD_R/RSD_I (RSD 比) を求めた。その結果、 IC_{50} を解析に用いた場合、エンジュ抽出物とトロロックスで RSD 比 ≤ 2 の基準を満たした。また、 $d\text{-}\alpha$ -トコフェロールの測定に関しては、今回の基準は満たさなかったものの、比較的室間再現性は高かったと判断した。一方で、チャ抽出物、 $d\text{-}\alpha$ -トコフェロール、ブドウ種子抽出物の RSD 比は 2 を超えていた。また、ORAC 法の室間共同試験結果との比較により、DPPH 法の室間再現性が ORAC 法よりも高いことが示された。以上の結果、標準物質のトロロックスと酸化防止剤のエンジュ抽出物に関しては高い室間再現性を確認できたことから、基本的な DPPH ラジカル消去活性測定プロトコールの妥当性は本試験において確認できたものと判断した。一部、天然由来酸化防止剤に対する検討課題は残ったものの、DPPH 法が酸化防止剤の力価評価の公定法として十分に利用できることが示唆された。

A. 研究目的

現在日本国内で使用されている酸化防止剤は、指定添加物と既存添加物の 2 種類に大別される。指定添加物は安全性と有効性が確認された上で成分規格が設定されている。一方、既存添加物は、平成 7 年の食品衛生法の改正に伴い、経過措置的にその使用が認められているものである。これらは天然由来の複雑な混合物である場合が多く、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。

既存添加物については規格基準の設定を目的として、成分組成の確認、有効成分の同定、及び定量法の開発が行われているが、現状の機器分析では不可能である場合も多い。従って、成分組成に基づいた規格が未だ設定できていない既存添加物に対しては一定の品質確保のため、抗酸化力価に基づいた新たな評価法を規格基準法として適用する必要があると考えられる。

そこで本事業では、脂質酸化抑制能評価法で

あるロダン鉄法, ラジカル消去活性測定法である 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法, 及び 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 法, 活性酸素消去活性測定法である 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1) 法, 及び Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法を酸化防止剤の力価評価法の候補として種々の検討を行ってきた。その結果, 脂質の酸化を直接的に評価するロダン鉄法との相関が最も高く, 再現性の面においても優れており, 測定操作が簡便である DPPH 法を酸化防止剤力価評価の公定法の候補として選択した。

分析法の公定法化においてはその妥当性を確認することが必要不可欠である。通常, 分析法の妥当性確認には, (1) 試験室間の共同試験, (2) 標準物質の利用, (3) 標準添加回収試験の実施, (4) 公定法あるいは標準的方法を用いて得られた結果との比較, (5) 合成試料の利用等の方法がある。中でも, (1) の試験室間の共同試験によるものが最も有効であるとされている。分析法の妥当性確認のための室間共同試験では, 使用する試薬, 試薬調製, 測定の手順等を設定し, 複数の試験室が測定した際の測定値のばらつきの程度を併行精度や室間再現精度などの統計的パラメータで評価する共同試験を実施する必要がある。そこで本研究では, 試料数 5 以上, 試験室数 8 以上と定めた国際ハーモナイズドプロトコールの基準¹⁾に基づき, DPPH 法に関する室間共同試験を実施し, 妥当性の確認を試みた。

B. 研究方法

(1) 室間共同試験

本共同試験には以下の 14 試験室が参加した: 九州大学大学院農学研究院, 金城学院大学

薬学部, 高知大学農学部, 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部, (財) 食品環境検査協会, (財) 食品分析開発センターSUNATEC, (財) 新日本検定協会, (財) 東京顕微鏡院, 名古屋市立大学大学院薬学研究科, (財) 日本食品分析センター, (財) 日本冷凍食品検査協会, 日本大学生物資源学部, 福岡女子大学人間環境学部, (財) マイコトキシン検査協会 (以降, これらの試験室を順不同で A~N と表記する。)。

参加試験室には試薬, ならびに測定試料の調製方法, 測定方法, データの取扱いなどを記した分析手順書を配布し, これに従い各試験室で DPPH 法による抗酸化活性測定を行った。

(2) 室間共同試験用試料

分析試料として, 標準物質の 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox: Sigma-Aldrich 製試薬), 食品添加物製品 (酸化防止剤) のチャ抽出物 (主成分: カテキン混合物), ブドウ種子抽出物 (主成分: プロアントシアニン), エンジュ抽出物 (主成分: ルチン), $d\alpha$ -ートコフェロールを使用した。各試料は同一ロットのものを各試験室に配布した。試薬や試料の保管方法, 各試料溶液調製時の秤取量, 定容方法, および希釈方法は分析手順書に詳細に記載した。

(3) DPPH ラジカル消去活性測定

室間共同試験における DPPH 法の測定は, 下記の手順に従って行った。発色試薬の DPPH は, 和光純薬工業製の同一ロットのものを各試験室に配布した。測定用試薬の調製方法は分析手順書中に詳細に記載した。また, 試薬類の秤量の際の静電気の影響を防ぐために, 静電気除去器具 (マスコット除電気, 石山製作所製) を全試験室に配布した。

3-1. DPPH 溶液調製方法

最小表示が 10 μg , またはそれ以下の値である化学はかりで DPPH 7.89 mg を秤量し, 99.5% エタノールに溶解後, 栓付メスシリンダー, またはメスフラスコで 99.5% エタノールを加えて 100 mL に定容した (0.2 mM DPPH 溶液). DPPH 溶液は, 調製直後から 1 時間程度までは時間とともに吸光度が低下することが経験的に知られている. そこで, 遮光して 2 時間放置し, 吸光度が定常状態になるのを待った. 放置時間終了後, 試験管, またはサンプリングチューブに DPPH 溶液 1 mL を量りとり, 99.5% エタノール 200 μL , 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μL を順次加えて混合し, 517 nm の吸光度を測定した. 吸光度測定 of ブランク溶液には, エタノール 1.2 mL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μL の混合液を用いた. 吸光度が 1.00 ± 0.05 の範囲内であれば調製した DPPH 溶液をそのまま測定に使用し, この際の吸光度が 1.05 を超えた場合には 99.5% エタノールを加えて希釈し, 吸光度を 1.00 ± 0.05 の範囲内に入るように調整してから測定に用いた. なお, DPPH 溶液は調製日当日に使い切り, 実験中は室温で遮光して保管した.

3-2. DPPH ラジカル消去活性測定手順

試験管, またはサンプリングチューブに試料溶液 200 μL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μL を添加して混合し, そこに DPPH 溶液 1 mL を加え, 直ちに試験管ミキサーで 10 秒間攪拌した. その後, 室温暗所にて静置した. DPPH 溶液の添加から正確に 30 分後に 517 nm の吸光度を測定した. 吸光度測定 of ブランク溶液には 99.5% エタノール 1.2 mL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μL の混合液を用いた. 吸光度測定には 1 mL 容セルを使用した.

試料溶液添加時の吸光度を A_s , 試料溶液の

代わりに 99.5% エタノールを添加した際の吸光度を A_c とし, 次の計算式から阻害率 (%) を求めた.

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

各濃度の試料溶液の DPPH ラジカル消去活性測定を 3 回繰り返した.

3-3. IC_{50} の算出方法

各試料の IC_{50} の算出は以下の手順に従って行った.

- ① 試料濃度 (x) に対して阻害率 (y) をプロットし, 回帰直線 ($y = ax + b$) を引いた. 回帰直線は原点を通らなくてもよいこととした. 阻害率が 70% 程度以上になると阻害曲線が頭打ちとなるため, 阻害率 70% 程度以下の測定点を使って回帰直線を引くことを推奨した.
- ② 50% の阻害率を挟む 2 点を選び出し, その 2 点を通る回帰直線 ($Y = AX + B$) を引いた. 回帰直線は原点を通らなくてもよいこととした.
- ③ ② の回帰式の Y に 50 を代入した際の X (試料濃度) を求めた.
- ④ 3 回の繰り返し測定 of 各回で求められた③ の値の平均値を求めた. これを試料の IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) とした.

3-4. トロロックス等価活性算出方法

試料の IC_{50} がトロロックスの IC_{50} と同一の活性を有しているとき, 各試料の DPPH ラジカル消去活性をトロロックス等価活性 (TEAC) で示すこととした. 算出には以下の式を用いた.

$$\text{TEAC} = \text{Trolox の } IC_{50} (\mu\text{g/mL}) / \text{試料の } IC_{50} (\mu\text{g/mL})$$

この TEAC の値が大きいほど試料の DPPH ラジ

カル消去活性が高いことを意味する。なお、今回の室間共同試験では、酸化防止剤試料の IC_{50} とトロロックスの IC_{50} は必ず同一日に測定した値を用いて TEAC を求めた。

(4) 統計処理

集計データの解析においては、まず、国際ハーモナイズドプロトコールの基準に基づき、Cochran 検定、Single-Grubbs 検定、Paired-Grubbs 検定による外れ値検定を行い、データの棄却を行った。その後、試料ごとに分散分析を行い、併行標準偏差 (SD_r)、室間再現標準偏差 (SD_R)、室内再現相対標準偏差 (RSD_r)、室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を算出し、最終的に RSD_R に対する RSD_r の比、すなわち RSD_R/RSD_r を求めた。なお、以下では RSD_R/RSD_r を RSD 比と表記する。データの解析には Microsoft Office Excel 2007 を使用した。

C. 研究結果と考察

(1) 各試料の DPPH ラジカル消去活性

共同試験において各試験室が報告した各種酸化防止剤の IC_{50} を表 1 に示した。各試料の IC_{50} は、チャ抽出物が $26.0 \pm 2.38 \mu\text{g/mL}$ 、ブドウ種子抽出物が $34.0 \pm 2.18 \mu\text{g/mL}$ 、エンジュ抽出物が $77.1 \pm 4.55 \mu\text{g/mL}$ 、 $d\text{-}\alpha\text{-}$ トコフェロールが $138 \pm 6.42 \mu\text{g/mL}$ 、トロロックスが $60.9 \pm 2.16 \mu\text{g/mL}$ であった。続いて、各試験室が報告した各種酸化防止剤の TEAC を表 2 に示した。TEAC は、チャ抽出物が 2.32 ± 0.166 、ブドウ種子抽出物が 1.76 ± 0.135 、エンジュ抽出物が 0.801 ± 0.218 、 $d\text{-}\alpha\text{-}$ トコフェロールが 0.448 ± 0.0128 であった。

(2) 妥当性確認

多くの化学分析法では、室間再現標準偏差は併行標準偏差の 1.5~2.0 倍の値であることが報告されている^{1, 2)}。この報告をもとに本試験

では、 $RSD_R/RSD_r \leq 2$ の基準を妥当性確認の指標として用いることとした。

2.1 吸光度を用いた妥当性確認

各試験室から報告された吸光度値をもとに RSD_R と RSD_r を算出し、その測定の妥当性について確認した。表 3~表 7 にチャ抽出物、ブドウ抽出物、エンジュ抽出物、 $d\text{-}\alpha\text{-}$ トコフェロール、トロロックスの DPPH ラジカル消去活性測定結果として各試験室から報告された吸光度値に基づく室間共同試験解析結果を示した。

その結果、チャ抽出物では、試験室 C ($10 \mu\text{g/mL}$)、試験室 F ($30 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$)、試験室 J ($20 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$) が外れ値と判断された。外れ値検定後に算出した各濃度の RSD 比は 2.33~3.85 あり、すべての濃度で RSD 比が 2 を超える結果となった。

ブドウ種子抽出物では、試験室 A ($48 \mu\text{g/mL}$) と試験室 B ($36 \mu\text{g/mL}$) が外れ値と判断された。外れ値検定後に算出した各濃度の RSD 比は 3.10~3.98 であり、すべての濃度で RSD 比が 2 を超える結果となった。

続いて、エンジュ抽出物では、試験室 K ($0 \mu\text{g/mL}$) と試験室 L ($80 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{g/mL}$) が外れ値と判断された。外れ値検定後に算出した各濃度の RSD 比は 1.75~4.60 であった。エンジュ抽出物では、1 点のみ ($80 \mu\text{g/mL}$) が $RSD_R/RSD_r \leq 2$ の基準を満たしていた。しかし、他の濃度はチャ抽出物、ブドウ種子抽出物と同様に、RSD 比は 2 を超えていた。

$d\text{-}\alpha\text{-}$ トコフェロールでは、試験室 B ($200 \mu\text{g/mL}$) が外れ値と判断された。外れ値検定後に算出した各濃度の RSD 比は 2.49~4.54 であったことから、すべての濃度において RSD 比が 2 を超える結果となった。

最後に、トロロックスでは、試験室 K ($20 \mu\text{g/mL}$, $40 \mu\text{g/mL}$, $60 \mu\text{g/mL}$, $80 \mu\text{g/mL}$) と試験室 L ($100 \mu\text{g/mL}$) が外れ値と判断された。

外れ値検定後に算出した各濃度の RSD 比は 1.06~1.67 となり、トロロックスの場合は全ての濃度で RSD 比 ≤ 2 の基準を満たした。

以上のように、妥当性確認に用いるデータとして各試験室の吸光度値を用いた場合、エンジュ抽出物 (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 1 点) とトロロックス (全試験濃度) で RSD 比 ≤ 2 の基準を満たしたものの、その他の酸化防止剤試料については、その基準を満たさなかった。

一般的に、吸光法は比較的安定性の高い測定系であると考えられている。しかし、本共同試験では、室内精度に比べ室間精度が大きな値を示す結果となった。そこで、各試験室から報告された各試料測定時の吸光度そのものを比較することで、試験室間で吸光度値に偏りがあるか否かを調べた。その結果、試験室 C, J, N から報告された吸光度は低い傾向にあり、試験室 D, L, K から報告された吸光度は高い傾向にあった。このことから、試験室間の吸光度値に偏りがあることが判明した。この偏りが、先の吸光度値を用いた妥当性確認において、多くの酸化防止剤で RSD 比が 2 を超えた原因のひとつであると推察された。

また、今回の共同試験のプロトコールでは、トロロックス、チャ抽出物、エンジュ抽出物では 10.0 mg、ブドウ種子抽出物では 12.0 mg、*d*- α -トコフェロールでは 20.0 mg を秤取するように記載されていたが、実際の秤取量は各試験室により若干異なっていた。このことも RSD 比を大きくする原因の一つとなったと推察された。

2.2 IC_{50} を用いた妥当性確認

IC_{50} は、コントロールの吸光度に対する酸化防止剤添加時の吸光度の低下の割合から阻害率を算出し、それをもとに作成した阻害曲線から 50% 阻害を示す濃度を求めたものである。従って、 IC_{50} には試験室の吸光度の偏りは反映

されないものと考えられた。そこで、各試験室で求められた各試料の IC_{50} を用いて、再度 RSD 比を求めた。その結果を表 8 に示した。

エンジュ抽出物 (試験室 L) とトロロックス (試験室 K) で外れ値が認められたが、その他の試料では外れ値は検出されなかった。各試料の IC_{50} から算出した RSD 比は、チャ抽出物で 3.44、ブドウ種子抽出物で 2.72、エンジュ抽出物で 1.13、*d*- α -トコフェロールで 2.16、トロロックスで 1.30 であった。チャ抽出物を除く 4 試料で IC_{50} から算出した RSD 比が吸光度から算出した値よりも低い値となった。また、トロロックス、エンジュ抽出物では RSD 比 ≤ 2 の基準を満たしたことから、 IC_{50} を用いた場合にはこれら 2 種類の酸化防止剤で DPPH 法の妥当性を確認することができた。一方で、チャ抽出物、ブドウ種子抽出物、*d*- α -トコフェロールでは依然として基準を満たしていなかった。

また、*d*- α -トコフェロールの場合、前述の通り RSD 比は 2.16 と比較的小さい値であった。また、 RSD_R (%) は 4.72 と RSD 比 ≤ 2 の基準を満たしたトロロックスの RSD_R (%) の 4.79 と同程度であった。このことから、*d*- α -トコフェロールの測定に関しては、今回の基準は満たさなかったものの、比較的室間再現性は高かったと判断した。

一方、チャ抽出物とブドウ種子抽出物の 2 品目は RSD_R (%) が 9.78, 6.82 と高い値となった。これらの酸化防止剤は吸湿性が高いため、今回の共同試験のように 10 mg 程度の秤取では、試料の保管中や秤量中の吸湿による採取量の誤差が生じた可能性があるものと推察された。従って、このことが、室間再現性を低くした原因の一つである可能性も否定できないものと考えられた。

しかしながら、標準物質のトロロックスと酸化防止剤のエンジュ抽出物に関しては、高い室

間再現性を確認できたことから、基本的な DPPH ラジカル消去活性測定プロトコールの妥当性は本試験において確認できたものと判断した。

(3) 他法との比較

抗酸化活性評価法の妥当性確認に関する報告例は皆無であり、唯一、11 試験室が参加した ORAC 法による室間共同試験の実施例が最近報告された³⁾。そこで、DPPH 法を用いた本室間共同試験結果と ORAC 法の室間共同試験結果の比較を行った。ORAC 法の室間共同試験では 5 種類の酸化防止剤 ((+)-カテキン、*trans*-フェルラ酸、カフェイン酸、ヘスペレチン、トロロックス) を測定試料としていた。得られた各酸化防止剤の RSD 比は、(+)-カテキン: 4.99, *trans*-フェルラ酸 : 3.12, カフェイン酸 : 3.86, ヘスペレチン : 2.54, トロロックス : 2.35 であった。一方で、本法で得られた各酸化防止剤の IC₅₀ から求めた RSD 比は 1.30~3.44 であり、ORAC 法よりも低い値を示した。また、両方法に共通で測定が行われたトロロックスに関しても、ORAC 法では RSD 比が 2.35 であったのに対し、本法で得た値は 1.30 であり、より低い値であった。加えて、ORAC 法の室間共同試験で用いた 5 種類の酸化防止剤は、いずれも単一化合物であり、-20℃で冷凍した状態で試料を配付していたことから、先に述べたような夾雑物質の影響や抗酸化成分の劣化の可能性は少ないものと考えられた。これらのことから、抗酸化活性の評価において、DPPH 法は ORAC 法よりも高い室間再現性を有することが明らかとなった。

以上のことから、天然由来酸化防止剤に対する検討課題は一部残ったものの、今回の室間共同試験結果より、DPPH 法が酸化防止剤の力価評価の公定法として十分に利用できることが示唆された。

D. 結論

既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価に対する公定法の設定を目的とし、DPPH 法の室間共同試験による妥当性確認を試みた。その結果、IC₅₀の値の室間再現性を調べた場合、エンジュ抽出物とトロロックスで RSD 比 ≤ 2 の基準を満たした。また、*d*- α -トコフェロールの測定に関しては、今回の基準は満たさなかったものの、比較的室間再現性は高かったと判断した。一方で、チャ抽出物、*d*- α -トコフェロール、ブドウ種子抽出物の RSD 比は 2 を超えていた。また、ORAC 法の室間共同試験結果との比較により、DPPH 法の室間再現性が ORAC 法よりも高いことが示された。

以上の結果、標準物質のトロロックスと酸化防止剤のエンジュ抽出物に関しては高い室間再現性を確認できたことから、基本的な DPPH ラジカル消去活性測定プロトコールの妥当性は本試験において確認できたものと判断した。一部、天然由来酸化防止剤に対する検討課題は残ったものの、DPPH 法が酸化防止剤の力価評価の公定法として十分に利用できることが示唆された。

E. 参考文献

- 1) 安井明美, 最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, 第 1 版, (サイエンスフォーラム, 東京) (2010).
- 2) Horwitz *et al.*, *J. AOAC.*, **63**, 1344 (1980).
- 3) 渡辺他, 食科工, **57**, 525 (2010).

F. 研究発表

(1) 論文発表

なし.

(2) 学会発表

1. 隅倉功大, 山崎壮, 柏木丈拵, 島村智子, 受田浩之:酸化防止剤の抗酸化活性評価に対する ORAC 法の適用性について, 日本食品科学工学会 第 57 回大会, 2010 年 9 月 (東京).

2. 隅倉功大, 吉田鉄平, 島村智子, 柏木丈拵, 山崎壮, 受田浩之:ロダン鉄法による酸化防止剤の脂質酸化抑制能の評価, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 (京都).