

表1 室間共同試験で各試験室が報告した各種酸化防止剤のIC<sub>50</sub>

試験室	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*				
	チャ抽出物	ブドウ種子抽出物	エンジュ抽出物	d $\alpha$ -トコフェロール	トロロックス
A	27.0 $\pm$ 0.409	38.0 $\pm$ 0.802	76.6 $\pm$ 0.354	141 $\pm$ 1.67	63.7 $\pm$ 1.37
B	25.2 $\pm$ 0.306	33.7 $\pm$ 1.81	75.6 $\pm$ 0.225	139 $\pm$ 5.43	61.1 $\pm$ 2.18
C	25.7 $\pm$ 1.03	33.5 $\pm$ 0.728	73.9 $\pm$ 1.54	133 $\pm$ 3.45	60.5 $\pm$ 1.85
D	29.4 $\pm$ 0.157	32.7 $\pm$ 0.144	77.6 $\pm$ 0.982	137 $\pm$ 0.839	63.5 $\pm$ 1.76
E	24.2 $\pm$ 0.426	31.1 $\pm$ 0.315	77.8 $\pm$ 0.927	133 $\pm$ 0.863	59.4 $\pm$ 2.59
F	30.8 $\pm$ 1.65	36.1 $\pm$ 0.819	78.1 $\pm$ 2.72	142 $\pm$ 2.98	63.5 $\pm$ 1.97
G	25.3 $\pm$ 0.768	33.4 $\pm$ 1.05	74.6 $\pm$ 0.130	128 $\pm$ 1.69	59.0 $\pm$ 0.372
H	24.4 $\pm$ 0.0351	33.5 $\pm$ 0	74.9 $\pm$ 0.0808	134 $\pm$ 0	58.4 $\pm$ 1.66
I	26.2 $\pm$ 0.605	32.9 $\pm$ 0.916	78.2 $\pm$ 0.528	143 $\pm$ 0.831	62.3 $\pm$ 0.881
J	20.7 $\pm$ 1.38	31.4 $\pm$ 0.442	74.6 $\pm$ 1.97	148 $\pm$ 6.38	59.3 $\pm$ 4.29
K	25.3 $\pm$ 0.0871	37.5 $\pm$ 1.38	76.4 $\pm$ 4.47	150 $\pm$ 3.05	59.0 $\pm$ 5.70
L	27.5 $\pm$ 0.358	35.9 $\pm$ 0.559	92.1 $\pm$ 1.24	137 $\pm$ 1.62	64.6 $\pm$ 3.78
M	25.7 $\pm$ 0.805	34.4 $\pm$ 0.924	75.3 $\pm$ 3.66	130 $\pm$ 4.12	59.0 $\pm$ 1.67
N	26.3 $\pm$ 0.448	31.5 $\pm$ 0.520	74.3 $\pm$ 1.35	135 $\pm$ 1.68	59.6 $\pm$ 1.64
総平均	26.0 $\pm$ 2.38	34.0 $\pm$ 2.18	77.1 $\pm$ 4.55	138 $\pm$ 6.42	60.9 $\pm$ 2.16

\* : 平均  $\pm$  標準偏差

表2 室間共同試験で各試験室が報告した各種酸化防止剤のTEAC

試験室	TEAC				
	チャ抽出物	ブドウ種子抽出物	エンジュ抽出物	d $\alpha$ -トコフェロール	
A	2.38	1.69	0.843	0.437	
B	2.30	1.84	0.813	0.453	
C	2.45	1.82	0.808	0.441	
D	2.24	1.89	0.819	0.456	
E	2.34	1.85	0.790	0.466	
F	1.99	1.81	0.806	0.458	
G	2.09	1.68	0.801	0.459	
H	2.32	1.73	0.781	0.450	
I	2.40	1.86	0.807	0.433	
J	2.70	1.77	0.821	0.435	
K	2.43	1.35	0.799	0.420	
L	2.33	1.76	0.761	0.448	
M	2.29	1.79	0.765	0.449	
N	2.25	1.85	0.798	0.460	

総平均\* 2.32  $\pm$  0.166 1.76  $\pm$  0.135 0.801  $\pm$  0.218 0.448  $\pm$  0.0128

\* : 平均  $\pm$  標準偏差

表3 吸光度に基づく室間共同試験解析結果 (チャ抽出物)

	濃度 (μg/mL)※					
	0	10	20	30	40	50
試験室数	14	13	13	13	14	12
平均値 (吸光度)	1.00	0.777	0.589	0.441	0.323	0.235
SD <sub>r</sub>	$9.00 \times 10^{-3}$	$8.03 \times 10^{-3}$	$7.79 \times 10^{-3}$	$7.43 \times 10^{-3}$	$9.25 \times 10^{-3}$	$6.16 \times 10^{-3}$
RSD <sub>r</sub> (%)	0.897	1.03	1.32	1.68	2.86	2.62
SD <sub>R</sub>	$3.46 \times 10^{-2}$	$2.03 \times 10^{-2}$	$1.81 \times 10^{-2}$	$1.86 \times 10^{-2}$	$3.45 \times 10^{-2}$	$1.92 \times 10^{-2}$
RSD <sub>R</sub> (%)	3.45	2.61	3.08	4.22	10.7	8.19
RSD <sub>R</sub> / RSD <sub>r</sub>	3.85	2.52	2.33	2.51	3.73	3.12

※ここでの「濃度」は設定目標濃度であり、実際の試料溶液の濃度はこの整数値ではない。

表4 吸光度に基づく室間共同試験の解析結果 (ブドウ種子抽出物)

	濃度 (μg/mL)※					
	0	12	24	36	48	60
試験室数	14	14	14	13	13	14
平均値 (吸光度)	1.01	0.818	0.639	0.472	0.316	0.229
SD <sub>r</sub>	$7.65 \times 10^{-3}$	$1.01 \times 10^{-2}$	$9.04 \times 10^{-3}$	$1.03 \times 10^{-2}$	$9.61 \times 10^{-3}$	$7.70 \times 10^{-3}$
RSD <sub>r</sub> (%)	0.757	1.24	1.42	2.18	3.04	3.36
SD <sub>R</sub>	$2.46 \times 10^{-2}$	$3.13 \times 10^{-2}$	$3.48 \times 10^{-2}$	$4.14 \times 10^{-2}$	$3.44 \times 10^{-2}$	$2.54 \times 10^{-2}$
RSD <sub>R</sub> (%)	2.44	3.83	5.45	8.69	10.9	11.1
RSD <sub>R</sub> / RSD <sub>r</sub>	3.22	3.10	3.85	3.98	3.58	3.30

※ここでの「濃度」は設定目標濃度であり、実際の試料溶液の濃度はこの整数値ではない。

表5 吸光度に基づく室間共同試験解析結果 (エンジュ抽出物)

	濃度 (μg/mL)※					
	0	20	40	60	80	100
試験室数	13	14	14	14	13	13
平均値 (吸光度)	1.01	0.877	0.744	0.612	0.473	0.364
SD <sub>r</sub>	5.21 × 10 <sup>-3</sup>	7.92 × 10 <sup>-3</sup>	8.74 × 10 <sup>-3</sup>	1.02 × 10 <sup>-2</sup>	1.24 × 10 <sup>-2</sup>	8.97 × 10 <sup>-3</sup>
RSD <sub>r</sub> (%)	0.516	0.903	1.18	1.67	2.63	2.46
SD <sub>R</sub>	2.39 × 10 <sup>-2</sup>	2.44 × 10 <sup>-2</sup>	2.77 × 10 <sup>-2</sup>	2.84 × 10 <sup>-2</sup>	2.17 × 10 <sup>-2</sup>	3.81 × 10 <sup>-2</sup>
RSD <sub>R</sub> (%)	2.37	2.79	3.73	4.64	4.60	10.5
RSD <sub>R</sub> /RSD <sub>r</sub>	4.60	3.08	3.18	2.79	1.75	2.35

※ここでの「濃度」は設定目標濃度であり、実際の試料溶液の濃度はこの整数値ではない。

表6 吸光度に基づく室間共同試験解析結果 (d-α-トコフェロール)

	濃度 (μg/mL)※					
	0	40	80	120	160	200
試験室数	14	14	14	14	14	13
平均値 (吸光度)	1.01	0.867	0.715	0.564	0.421	0.289
SD <sub>r</sub>	5.84 × 10 <sup>-3</sup>	7.91 × 10 <sup>-3</sup>	1.14 × 10 <sup>-2</sup>	1.08 × 10 <sup>-2</sup>	1.22 × 10 <sup>-2</sup>	9.50 × 10 <sup>-3</sup>
RSD <sub>r</sub> (%)	0.576	0.912	1.60	1.92	2.90	3.29
SD <sub>R</sub>	2.65 × 10 <sup>-2</sup>	2.94 × 10 <sup>-2</sup>	2.84 × 10 <sup>-2</sup>	3.21 × 10 <sup>-2</sup>	3.69 × 10 <sup>-2</sup>	3.74 × 10 <sup>-2</sup>
RSD <sub>R</sub> (%)	2.61	3.39	3.98	5.69	8.76	12.9
RSD <sub>R</sub> /RSD <sub>r</sub>	4.54	3.71	2.49	2.96	3.02	3.94

※ここでの「濃度」は設定目標濃度であり、実際の試料溶液の濃度はこの整数値ではない。

表7 吸光度に基づく室間共同試験解析結果 (トロロックス)

	濃度 (μg/mL)※					
	0	20	40	60	80	100
試験室数	14	13	13	13	13	13
平均値 (吸光度)	1.01	0.857	0.690	0.524	0.356	0.206
SD <sub>r</sub>	2.22 × 10 <sup>-2</sup>	2.28 × 10 <sup>-2</sup>	2.61 × 10 <sup>-2</sup>	2.98 × 10 <sup>-2</sup>	3.25 × 10 <sup>-2</sup>	1.58 × 10 <sup>-2</sup>
RSD <sub>r</sub> (%)	2.20	2.67	3.77	5.68	9.12	7.67
SD <sub>R</sub>	2.57 × 10 <sup>-2</sup>	2.58 × 10 <sup>-2</sup>	2.77 × 10 <sup>-2</sup>	3.35 × 10 <sup>-2</sup>	3.72 × 10 <sup>-2</sup>	2.63 × 10 <sup>-2</sup>
RSD <sub>R</sub> (%)	2.55	3.00	4.01	6.40	10.5	12.8
RSD <sub>R</sub> / RSD <sub>r</sub>	1.16	1.12	1.06	1.13	1.15	1.67

※ここでの「濃度」は設定目標濃度であり、実際の試料溶液の濃度はこの整数値ではない。

表8 IC<sub>50</sub>に基づく室間共同試験解析結果

	チャ抽出物	ブドウ種子抽出物	エンジュ抽出物	$\alpha$ -トコフェロール	トロロックス
試験室数	14	14	13	14	13
平均値 (IC <sub>50</sub> )	26.2	34.1	76.0	138	61.1
SD <sub>r</sub>	0.745	0.854	1.98	3.02	2.25
RSD <sub>r</sub> (%)	2.84	2.51	2.61	2.19	3.68
SD <sub>R</sub>	2.56	2.33	2.23	6.52	2.93
RSD <sub>R</sub> (%)	9.78	6.82	2.94	4.72	4.79
RSD <sub>R</sub> /RSD <sub>r</sub>	3.44	2.72	1.13	2.16	1.30

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

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

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  
研究協力者 松井 利郎 九州大学大学院農学研究院 准教授  
研究協力者 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 丈広 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

酸化防止剤は食品中の脂質の酸化を防ぐことを目的に使用される。過去の研究において酸化防止剤の力価評価に利用可能と判断した DPPH 法, ABTS 法, WST-1 法, ORAC 法は, いずれもラジカル種や活性酸素種の消去活性を評価する手法であり, 脂質酸化抑制能を直接的に評価するものではない。従って, 実際の脂質酸化に対する酸化防止剤の力価評価を行うことは重要であると考えられた。本研究では, 代表的な脂質酸化抑制能評価法であるロダン鉄法の改良を行った後, 35 種類の酸化防止剤の力価評価を行った。その結果, 改良ロダン鉄法を用いることにより 32 種類の酸化防止剤の脂質酸化抑制能を求めることが可能であり, 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法化は難しいと考えられたため, 酸化防止剤の力価評価においてロダン鉄法の結果を最も反映し得る方法の選択を行った。その結果, ロダン鉄法との回帰分析結果, 再現性の高さ, 測定の簡便さから総合的に判断して, DPPH 法を候補として選択した。今後は, 酸化防止剤力価評価に対する公定法化を目的とした, DPPH 法の妥当性確認を行う必要がある。

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た。そこで本事業では, 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'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 法, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-

nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-1) 法を酸化防止剤の力価評価法の候補として提案し、小規模共同試験を行った結果、これらの3つの方法が酸化防止剤の品質評価法として適用可能であることを報告した<sup>1)</sup>。また、近年、米国や日本国内で使用頻度が高まっているOxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法の酸化防止剤力価評価に対する適用性についても検討を行ってきた。

これまで検討を行ってきた DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法、ORAC 法は、いずれもラジカル種や活性酸素種の消去活性を評価する手法であり、その反応系に脂質は用いられない。しかし、酸化防止剤の本来の目的は、食品中に含まれる脂質の酸化を防ぐことである。これまでの研究において、前述の4法は酸化防止剤の力価評価に適用可能であると判断されたが、これらの方法は脂質酸化の抑制を直接的に評価するものではない。そのため、食品成分である脂質の酸化に対する酸化防止剤の力価評価を行うことは重要であると考えられた。そこで本研究では、代表的な脂質過酸化抑制能評価法であるロダン鉄法の改良を行った後、35種類の酸化防止剤の力価評価を行った。さらに、DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法、ORAC 法とロダン鉄法の間で測定可否と再現性について比較した。また、ロダン鉄法と他の4法で得られた結果との間の回帰分析を行い、他の方法との関連について調べ、酸化防止剤の力価評価においてロダン鉄法の結果を最も反映し得る方法の選択を行った。

## B. 研究方法

### (1) 試薬

本研究では、下記の35種類の酸化防止剤を試料として用いた：チャ抽出物(4種類)、緑茶エキス、生コーヒー豆抽出物、ブドウ種子抽出物、酵素処理イソクエルシトリン、酵素処理

ルチン、コメヌカ酵素分解物、単糖・アミノ酸複合物、カテキン、没食子酸、トコトリエノール、*d*- $\alpha$ -トコフェロール(2種類)、*d*- $\gamma$ -トコフェロール、*d*- $\delta$ -トコフェロール、(+)- $\delta$ -トコフェロール、ミックストコフェロール、フェルラ酸(2種類)、ヤマモモ抽出物、ルチン、エンジュ抽出物、ローズマリー抽出物(2種類)、 $\gamma$ -オリザノール、カンゾウ油性抽出物、ルチン酵素分解物、コメヌカ油抽出物、セサモール、ケルセチン、モリン、エラグ酸。また、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)、リノール酸、2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) はSigma-Aldrich製を用いた。Tween 40 は和光純薬工業製を用いた。その他の試薬は、すべて市販の特級試薬を用いた。すべての実験において蒸留水をAuto Pure WQ501 (Millipore製)に通して処理した非抵抗18  $\Omega \cdot \text{cm}$  のMilliQ水を用いた。

### (1) ロダン鉄法

ロダン鉄法による脂質酸化抑制能評価の手順は、満田ら<sup>2)</sup>の方法を基礎とし、本研究において各種条件を改良した。改良後の測定手順は以下の通りである。脂質としてリノール酸を用い、界面活性剤 Tween 40 と混合したリノール酸混合溶液として使用した。リノール酸 20 mg に Tween 40 0.2 g、超純水 20 mL を混合し、10 分間超音波処理 (47 kHz) し、0.1%リノール酸混合溶液を調製した。リノール酸反応溶液は次のように調製した。試験管に 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 500  $\mu\text{L}$ 、0.1%リノール酸混合溶液 1 mL、100 mM AAPH 200  $\mu\text{L}$ 、試料溶液 800  $\mu\text{L}$  を順次添加し攪拌した後、37°C で5時間インキュベーションした。反応終了後、サンプルチューブに75%エタノール4.7 mL、上記のリノール酸反応溶液100  $\mu\text{L}$ 、30%チオシア

ン酸アンモニウム水溶液 100  $\mu\text{L}$ , 3.5%塩酸溶液で調製した 20 mM 塩化鉄(II)溶液 100  $\mu\text{L}$  を順次添加し, 10 秒間のピペッティングによる攪拌の後, 10 秒間のボルテックスによる攪拌を行った. 20 mM 塩化鉄(II)溶液の添加から正確に 3 分後に 500 nm における吸光度 (As) を測定した. 試験溶液の代わりに試料溶媒 (20 mM リン酸カリウム緩衝液: pH 7.4, もしくは 99.5%エタノール) を用いた際の吸光度をコントロール (Ac) として, 試料の阻害率 (%) を以下の式にて求めた.

$$\text{阻害率 (\%)} = (\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac} \times 100$$

50%阻害を与える試料溶液の濃度を  $\text{IC}_{50}$  とした. 同様の手順にて, 標準物質である Trolox の  $\text{IC}_{50}$  を求めた. Trolox の  $\text{IC}_{50}$  と試料の  $\text{IC}_{50}$  が等価であるとみなし, 各試料の脂質酸化抑制能を Trolox 等価活性 (TEAC) で表した. TEAC の算出には以下の式を用いた.

Trolox 等価活性 (TEAC) =

$$\text{Trolox の } \text{IC}_{50} (\mu\text{g}/\text{mL}) / \text{試料の } \text{IC}_{50} (\mu\text{g}/\text{mL})$$

この手順を 3 回繰り返し, 各回で求められた TEAC の平均値を各酸化防止剤の TEAC とした.

## C. 研究結果と考察

### (1) ロダン鉄法の改良

ロダン鉄法は, 脂質の酸化によって生成する過酸化物質 (ヒドロペルオキシド) を測定する方法である. 過酸化脂質により 2 価鉄が 3 価鉄に酸化され, 生成した 3 価鉄がチオシアン酸アンモニウムと反応して赤色のロダン鉄  $\text{Fe}(\text{SCN})_3$  を生成する. これを比色定量することによって脂質の過酸化度を評価することができる. ロダン鉄法は, 1900 年代前半に報告された方法であり, 代表的な抗酸化活性測定法

として数多くの研究において使用されてきた. 様々な変法が存在しているが, 基本的には, リノール酸と抗酸化物質を共存させて一定時間反応させ, その反応溶液の一部に塩化鉄(II)溶液とチオシアン酸アンモニウム溶液を加え, 生成したロダン鉄の赤色を比色定量するというものである. リノール酸反応溶液の組成としては, 試料, リノール酸にエタノール, およびリン酸塩緩衝液, あるいは, そのどちらか一方を添加というものが一般的であったが, リノール酸の酸化の進行が緩やかであり, 測定終了までに 24 時間以上, 長くて 10 日程度の時間を要する. そこで酸化促進剤として AAPH を添加する<sup>3)</sup>, Tween などの界面活性剤を使用する<sup>4)</sup> などの改良が加えられてきたが, 短時間での測定は実現していなかった.

実際に, 本研究においても, リノール酸, エタノール, AAPH, 酸化防止剤を含む溶液を 50°C で反応させ, ロダン鉄法による脂質酸化抑制能の測定を試みたが, 試料溶媒としてエタノールを使用した系において, 過酸化物質の生成が 1 週間経過後も認められず, 測定自体を行うことができなかった. そこで, 短時間で再現性の良い測定を行うことを目的として, 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った.

その結果, リノール酸と Tween 40 の混合の際に超音波処理を施し, 出来る限りエマルジョン化することとした. その濃度は 0.1%とした. 反応溶液の組成は, 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 500  $\mu\text{L}$ , 0.1%リノール酸溶液 (Tween 40 含む) 1 mL, 100 mM AAPH 200  $\mu\text{L}$ , 試料 800  $\mu\text{L}$  とした. この溶液を 37°C で 5 時間インキュベーションした後, コントロールの測定を行ったところ, その変動係数は 3.8% ( $n = 3$ ) であった. 短時間での測定が可能であり, かつ再現性も高かったことから, 酸化防止剤の力価評価の測定条件は前述の条件で行うこととした.



## (2) ロダン鉄法による酸化防止剤の評価

35 種類の酸化防止剤をロダン鉄法に供し、TEAC の算出の可否を調べた。その結果、32 種類の酸化防止剤について TEAC を求めることが可能であった。測定できなかった 3 種類の酸化防止剤はコメヌカ酵素分解物、単糖・アミノ酸複合物、没食子酸（いずれも水溶性）であり、これらは飽和濃度においても阻害率が 50%に達せず、その IC<sub>50</sub> を求めることができなかった。

水溶性酸化防止剤の TEAC を図 1 に示した。TEAC が高いほど、脂質酸化抑制能が高いことを意味する。測定の結果、チャ抽出物 D の脂質酸化抑制能が最も高く、以下、チャ抽出物 A、ブドウ種子抽出物、カテキン、酵素処理イソクエルシトリン、酵素処理ルチン、チャ抽出物 B、チャ抽出物 C、緑茶エキス、生コーヒー豆抽出物の順であった。次に、脂溶性酸化防止剤の TEAC を図 2 に示した。その結果、ケルセチンの脂質酸化抑制能が最も高く、以下、エラグ酸、ルチン酵素分解物、セサモール、エンジュ抽出物、ローズマリー抽出物 A、(+)- $\delta$ -トコフェロール、ミックストコフェロール、*d*- $\alpha$ -トコフェロール B、*d*- $\gamma$ -トコフェロール、トコトリエノール、フェルラ酸 B、*d*- $\delta$ -トコフェロール、ヤマモモ抽出物、コメヌカ油抽出物、フェルラ酸 A、ルチン、モリン、*d*- $\alpha$ -トコフェロール A、カンゾウ油性抽出物、 $\gamma$ -オリザノール、ローズマリー抽出物 B の順であった。

水溶性酸化防止剤と脂溶性酸化防止剤では脂溶性酸化防止剤の方が、全体的に TEAC が高いことが明らかとなった。これは、ロダン鉄法が脂質の酸化抑制を評価する方法であり、反応が水系ではないため、水溶性酸化防止剤の TEAC が低くなり、一方で脂溶性酸化防止剤の TEAC が高くなったものと考えられた。

今回の測定において、35 種類中 32 種類の酸化防止剤について TEAC を求めることができた

ことから、ロダン鉄法による酸化防止剤の力価評価が可能であることが判明した。過去に酸化防止剤の力価評価に対する適用性を検討した 4 法で測定可能であった酸化防止剤の数は、DPPH 法と ABTS 法で 33 種類、WST-1 法で 25 種類、ORAC 法で 23 種類であった。このことから、ロダン鉄法は、DPPH 法と ABTS 法と同様の広い適用範囲を有することが明らかとなった。

また、ロダン鉄法の酸化防止剤評価時の変動係数は、平均で  $9.0 \pm 7.4\%$ （平均±標準偏差）であった。他の 4 法の場合は、DPPH 法で  $1.9 \pm 1.5\%$ 、ABTS 法で  $2.3 \pm 1.4\%$ 、WST-1 法で  $8.4 \pm 6.7\%$ 、ORAC 法で  $7.4 \pm 4.2\%$ であったことから、今回評価を行ったロダン鉄法の再現性は他の抗酸化活性測定法と比較して低い傾向にあることが判明した。ロダン鉄法のコントロールに限った場合の変動係数は前述の通り 3.8%であったことから、測定系に自体に問題はないと考えられた。天然物由来酸化防止剤は単一化合物とは異なり、抗酸化物質（活性物質）以外の夾雑物質も含まれている。このような夾雑物質が脂質酸化の程度に何らかの影響を及ぼし、再現性の低下を引き起こした可能性があると考えられた。

## (3) ロダン鉄法と他の抗酸化活性測定法との比較

ロダン鉄法は、脂質の酸化抑制を直接的に評価する方法であることから、酸化防止剤の力価評価の標準法として位置付けることができる。本来であれば、ロダン鉄法のような脂質酸化抑制能評価法を公定法とすることが望ましいが、操作の煩雑さ、測定時間の長さ、再現性の低さなどから公定法化は現実的には難しい。従って、脂質酸化抑制能を反映し得る抗酸化活性法を、酸化防止剤の力価評価の公定法とすることが望ましいと考えられた。

そこで、ロダン鉄法と他の抗酸化活性測定法

で得られた結果との回帰分析を行い、各測定法との関連について調べた。その結果を表1に示した。回帰分析は、全酸化防止剤、水溶性酸化防止剤、脂溶性酸化防止剤の3群について行った。その結果、DPPH法、ABTS法では、全酸化防止剤、水溶性酸化防止剤、脂溶性酸化防止剤の3群全てについてロダン鉄法との間に有意な相関が認められた。その一方で、WST-1法、あるいはORAC法とロダン鉄法との間では全酸化防止剤については有意な相関は認められず、WST-1法では脂溶性酸化防止剤、ORAC法では水溶性酸化防止剤に限った場合のみ有意な相関が認められた。

先にも述べたように、DPPH法とABTS法は全酸化防止剤、水溶性酸化防止剤、脂溶性酸化防止剤の3群全てについてロダン鉄法との間に有意な相関が認められたことから、両測定法は共にロダン鉄法の結果を反映し得る方法であると考えられた。しかし、DPPH法とABTS法を比較した場合、DPPH法とロダン鉄法間の相関係数が3群全てにおいて高かったこと、再現性の面においてDPPH法が最も優れていたこと、ABTS法では試薬調製に12~16時間を要すること、などから総合的に判断して、ロダン鉄法の代替法としてはDPPH法が最も適していると判断した。

今後は、酸化防止剤力価評価に対する公定法化を目的とした、DPPH法の妥当性確認を行う必要がある。

#### D. 結論

改良ロダン鉄法による酸化防止剤の力価評価が可能であることを明らかとした。ロダン鉄法は、脂質の酸化抑制を直接的に評価する方法

であることから、酸化防止剤の力価評価の標準法として位置付けることができる。本来であれば、ロダン鉄法のような脂質酸化抑制能評価法を公定法とすることが望ましいが、操作の煩雑さ、測定時間の長さ、再現性の低さなどから公定法化は現実的には難しい。そこで、酸化防止剤の力価評価においてロダン鉄法の結果を最も反映し得る方法の選択を行った結果、DPPH法を候補として選択した。今後は、酸化防止剤力価評価に対する公定法化を目的とした、DPPH法の妥当性確認を行う必要がある。

#### E. 参考文献

- 1) 島村他, 食科工, **54**, 482 (2007).
- 2) 満田他, 栄養と食糧, **19**, 210 (1966).
- 3) 長島他, 食科工, **46**, 382 (1999).
- 4) Güllçin, *Life Sci.*, **78**, 803 (2006).

#### 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).

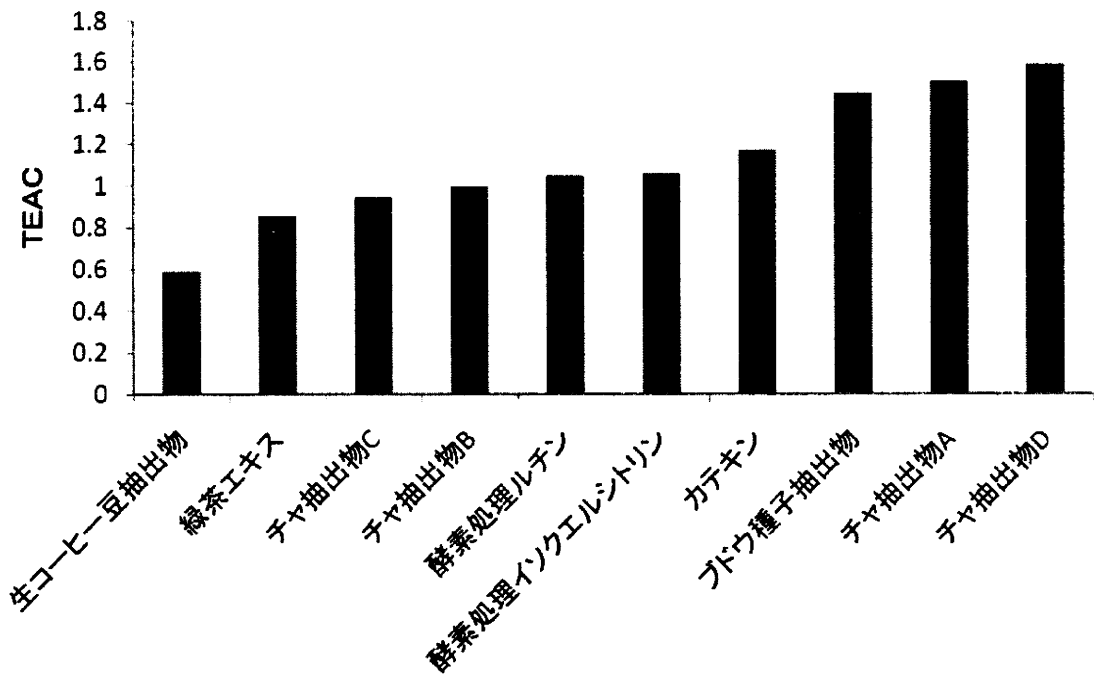


図1 水溶性酸化防止剤の脂質酸化抑制能

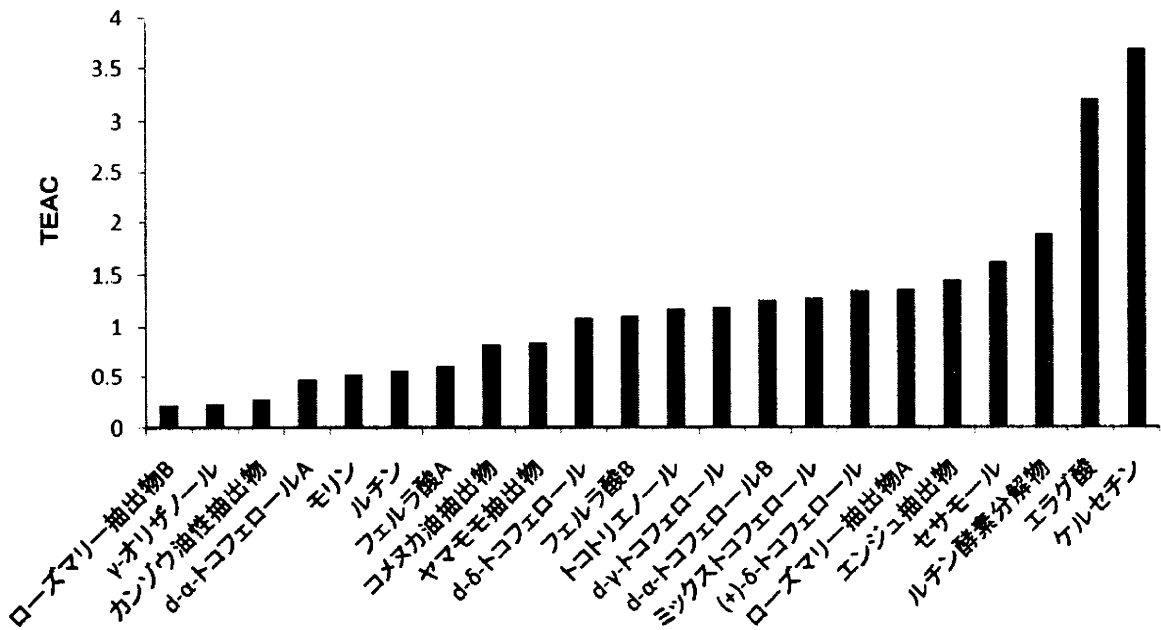


図2 脂溶性酸化防止剤の脂質酸化抑制能

表1 ロダン鉄法と他の抗酸化活性測定法との相関

測定法	酸化防止剤	回帰式	相関係数	n 数
DPPH 法	全	$y = 0.834x + 0.0548$	0.758*	32
	水溶性	$y = 1.554x - 0.349$	0.817*	10
	脂溶性	$y = 0.812x - 0.102$	0.830*	22
ABTS 法	全	$y = 0.568x + 0.1569$	0.553*	31
	水溶性	$y = 1.36x - 0.6225$	0.787*	10
	脂溶性	$y = 0.524x + 0.157$	0.541*	21
WST-1 法	全	$y = 28.5x + 10.862$	0.411	22
	水溶性	$y = 87.2x - 26.669$	0.481	10
	脂溶性	$y = 28.2x - 12.29$	0.611*	12
ORAC 法	全	$y = 1752x + 6227.4$	0.422	20
	水溶性	$y = 7048x - 516.97$	0.821*	10
	脂溶性	$y = 1037x + 8116.8$	0.306	10

\* Significant (p < 0.05)

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 年度分担研究報告書

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

研究分担者 松井 利郎 九州大学農学研究院 准教授

研究協力者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

研究協力者 石川 洋哉 福岡女子大学 人間環境学部 准教授

#### 研究要旨

抗酸化物質の併用性評価のため、薬剤の併用効果判定に汎用されている Median effect analysis の適用性を昨年度に引き続き検討した。本年度は、「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単一の成分からなる 5 種類の添加物、及びカテキン類( エピカテキン, エピカテキンガレート( ECg ), テピガロカテキン( EGC ), エピガロカテキンガレート( EGCg ) )を用い、ORAC 法により 7 通りの組合せで併用性評価を試みた。その結果、2 組は相乗性、1 組は相加性を示し、残りの 4 組は濃度範囲が低濃度から高濃度になるに従い、相乗性から相加性と濃度依存性を示した。また、本実験では相殺性を示す組合せは認められなかった。

次いで、DPPH 法を用いて併用効果発現因子の解明を目的として、DPPH ラジカル消去速度に着目し、併用性発現との関連性を検討した。その結果、各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、遅い物質との組合せは相殺性を示す傾向が認められた。以上より、抗酸化性評価基準のひとつとしてラジカル消去過程での消去速度が抗酸化物質の重要な機能因子となることが示唆された。

#### 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を設定する上では、酸化防止剤の相互作用を評価することは極めて重要である。特に、複数の酸化防止剤使用時に相殺効果が生じた場合、期待される抗酸化効果が得られなくなるため重大な問題となる。しかしながら、併用効果の解析方法は確立されておらず、その対応が急務となっている。我々は、平成 17~19 年度厚生科学研究「天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究」において、抗酸化成分の併用効果の検討に使用された実績を有する Fractional product method<sup>1)</sup>を用いて酸化防止剤の併用効果の判定を試みた。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<sup>2,3)</sup>ことから、予測値(  $I_E$  )と実測値とを比較することにより、2 成分混合系における酸化防止剤の併用性効果( 相乗効果、相加効果、相殺効果 )を検討してきた。

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

しかしながら、Fractional product method では、個々の化合物が独立して作用し、且つその反応が双曲線型に当てはまる場合にしか適用できないという制限がある。そこで平成 20 年度、さらに有効な併用効果の解析法を模索し、薬剤の併用効果解析法として用いられてきた

『 Median effect analysis 』を抗酸化食品成分における併用性評価の新規解析法として新たに提案した。

本法は、Chou ら<sup>4)</sup>が考案した方法であり、実験結果をもとに薬剤の反応型を推定し、反応型に応じた併用効果の解析を行うため、汎用性が極めて高い。さらに、本法により阻害割合に応じた CI (Combination Index) 値を算出することにより、併用効果を詳細に検討することが可能となる。本年度までに、「既存添加物名簿収載品目リスト」に収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 8 種類の添加物を用い、16 通りの組合せで DPPH 法による測定を行い、その結果を Median effect analysis により解析し併用効果を判定した。同様に、WST-1 法を用いて 8 通りの組合せで併用効果を検討した結果、DPPH 法と WST-1 法では概ね一致した結果が得られた。今年度は、測定法を ORAC 法に変え、Median effect analysis への適用を試みた。

本年度は、さらに DPPH 法を用いて併用効果発現因子の解明を目的として、DPPH ラジカル消去速度に着目し、併用性発現との関連性の検討を試みた。「既存添加物名簿収載品目リスト」に収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 8 種類の添加物を用い、一部改良した DPPH 法により各抗酸化物質のラジカル消去速度を測定した。ラジカル消去速度のうち、本実験では初速度に着目し、各抗酸化物質の初速度を算出した。

## B. 研究方法

### (1) ORAC 法

Prior らの方法を一部変更して行った<sup>5)</sup>。96 穴マイクロプレートに 20  $\mu\text{L}$  の試料溶液、200  $\mu\text{L}$  の 94.4 nM Fluorescein working solution を添

加し、10 分間 37°C でプレインキュベーションした後、励起波長 485 nm、蛍光波長 515 nm で蛍光強度を測定した。次いで、37°C で 10 分間プレインキュベーションした 31.7 mM 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH) をマルチチャンネルピペットで 75  $\mu\text{L}$  添加し、直ちにマイクロプレートリーダーにセットした。攪拌後、測定温度 37°C、2 分間隔で 90 分間、蛍光強度を測定した。ブランクには試料溶液の代わりに試料溶媒を添加した。測定値から曲線下面積: Area under the curve (AUC) を算出し、各試料の AUC からブランクの AUC を差し引いたものを netAUC とした。

$$\text{AUC} = (0.5 \times f_{8\text{min}} + f_{10\text{min}} + f_{12\text{min}} + \dots + f_{88\text{min}} + 0.5 \times f_{90\text{min}}) / f_{0\text{min}} \times 2$$

$f_{i\text{min}}$ : 測定開始  $i$  分後の蛍光強度

$$\text{netAUC} = \text{AUC}_{\text{Sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$$

標準溶液として用いた Trolox 溶液の netAUC を X 軸に、濃度を Y 軸にとったグラフより、二次回帰式 ( $Y = ax^2 + bx + c$ ) を求め、この式から相対 ORAC を算出した。

相対 ORAC 値 ( $\mu\text{mol} / \mu\text{mol}$ ) =

$$\frac{[a \times (\text{netAUC}_{\text{Sample}})^2 + b \times (\text{netAUC}_{\text{Sample}}) + c]}{[\text{Sample}]}$$

次いで、脂質ペルオキシラジカル捕捉率を算出した。測定開始 0 分後の蛍光強度が、測定時間である 90 分間持続すると仮定した場合の AUC からブランク測定時の AUC を差し引いた際の netAUC を 100% とした。これに対し、抗酸化物質添加時の各濃度における netAUC の占める比率を、ペルオキシラジカル捕捉率と設定した (Fig. 1)。

### (2) DPPH ラジカル消去速度測定法

Choi らの方法を一部変更して行った<sup>6)</sup>。0.2

mM DPPH / EtOH 溶液 1.5 mL 及び 0.1 M Tris-HCl buffer (pH7.4) 1.0 mL を十分に混合し、3 mL 容の石英セルに移したのち、517 nm にて吸光度測定を開始した。次いで、測定開始 10 秒後に試料 / EtOH 溶液 300  $\mu$ L 及び 0.1 M Tris-HCl buffer (pH7.4) 200  $\mu$ L の混合溶液を累加添加後、0.2 秒間隔で 80 秒間吸光度測定を行った。初速度 ( $\times 10^3$  [U/mol]) は、測定開始後の時間を X 軸に、測定値を Y 軸にとったグラフの直線領域の傾きとした。(Fig. 2)

### (3) 併用効果解析法

併用効果の判定は、以下の式( Median effect equation )に基づく解析法である Median effect analysis により行った。解析法の詳細については平成 20 年度の厚生科研研究報告書に記載している。

$$Fa / Fu = ( D / Dm )^m$$

本実験では、各酸化防止剤( 単独使用 )について ORAC 法による活性測定を行った後、2 種類の酸化防止剤を各々の IC<sub>50</sub> [  $\mu$ M ] の比 ( モル比 ) に近い割合で混合し、再度測定を行った。得られた測定結果を基に Median effect plot を行い、Combination Index ( CI ) 値を算出した。なお、本実験では、一連の解析( Median effect plot の作成及び CI 値の算出 ) に、市販の解析ソフト( Biosoft 社 CalcuSyn ver. 2.0 ) を使用した。

## C. 研究結果及び考察

### (1) ORAC 法を用いた Median effect analysis による併用性評価

「既存添加物名簿収載品目リスト」に収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 5 種類の添加物 ( カテキン、ケセル

チン、フェルラ酸、エラグ酸、没食子酸 ) 及び 4 種類のカテキン類 ( EC, ECg, EGC, EGCg ) 用い、7 通りの組合せで併用性評価を試みた。判定結果は、Table 1 に DPPH 法の結果と併せて示した。

Median effect analysis による解析の結果、相乗効果 2 組、相加効果 1 組という判定結果が得られた。さらに、4 組の組合せが濃度変化に伴い、相乗 / 相加という濃度依存性を示した。また、本実験においては、相殺性を示す組合せは認められなかった。なお、測定に供した代表的な 3 組の組合せに関して、それぞれの CI plot を Fig. 3 に示した。ORAC 法及び DPPH 法の解析結果を比較すると、そのほとんどが異なる結果となった。これは、各測定法における反応機構が異なるという点に起因すると考えられる。

ORAC 法は、DPPH 法や WST-1 法とは異なり、抗酸化作用の持続時間及び力価の同時評価が可能である。そのため、従来の ORAC 法では阻害率算出の概念が適用されていない。しかし、本実験では ORAC 法の結果を Median effect analysis に適用するため、便宜的に測定開始 0 分後の蛍光強度が 90 分間持続すると仮定し、抗酸化物質を添加した際の netAUC が占める比率からラジカル捕捉率を算出した。しかしながら、以上のような計算法の ORAC 法に対する適用例は、これまで報告されていない。よって、今後もこの計算方法の適用性を検証していく必要があると考えられる。

### (2) DPPH ラジカル消去速度測定及び併用効果発現因子の解明

「既存添加物名簿収載品目リスト」に収載されている天然物酸化防止剤 8 種類を用い、既存の DPPH 法の一部を改良した DPPH ラジカル消去速度測定法により各抗酸化物質のラジカル消去速度を測定し、Median effect analysis により得られた結果に基づき、併用効果発現因子

の解明を試みた。各抗酸化物質のラジカル捕捉速度及び併用性評価による結果を併せて示した (Table 2.)。その結果、各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、遅い物質との組合せは相殺性を示す傾向が認められた (Fig. 4)。以上より、相乗性 (あるいは相殺性) は各成分のラジカル捕捉速度に依存して発現していると考察され、抗酸化性評価基準のひとつとしてラジカル消去過程での捕捉速度が抗酸化物質の重要な機能因子となっていることが示唆された。

#### D. 結論

昨年度に引き続き、薬剤の併用効果判定に汎用されている Median effect analysis の適用性を検討した。9種類の抗酸化物質を用い、ORAC法により7通りの組合せにおける併用性評価を試みた結果、DPPH法とは概ね異なる結果が得られた。

併用性発現因子の解明を図ったところ、相乗性 (あるいは相殺性) は各成分のラジカル捕捉速度に依存して発現していると考察された。これより、抗酸化性評価基準のひとつとしてラジカル消去過程での消去速度が抗酸化物質の重要な機能因子となっていることが示唆された。

#### E. 研究発表

なし

#### F. 参考文献

- 1) J. L. Webb *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol 1, pp 55-79, Academic press, New York (1963).
- 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) T. C. Chou and P. Talalay *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 27-55(1984)
- 5) Prior, L. R. et al., *J. Agric. Food Chem.*, **51**(11), 3273-3279(2003)
- 6) H-S. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4156-4161 (2000).



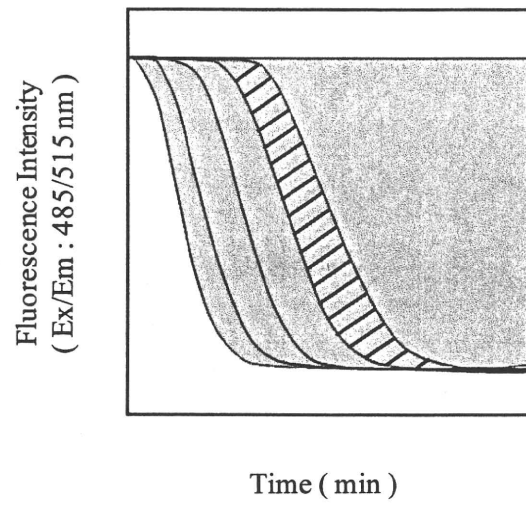


Fig. 1 ペルオキシラジカル捕捉率の算出

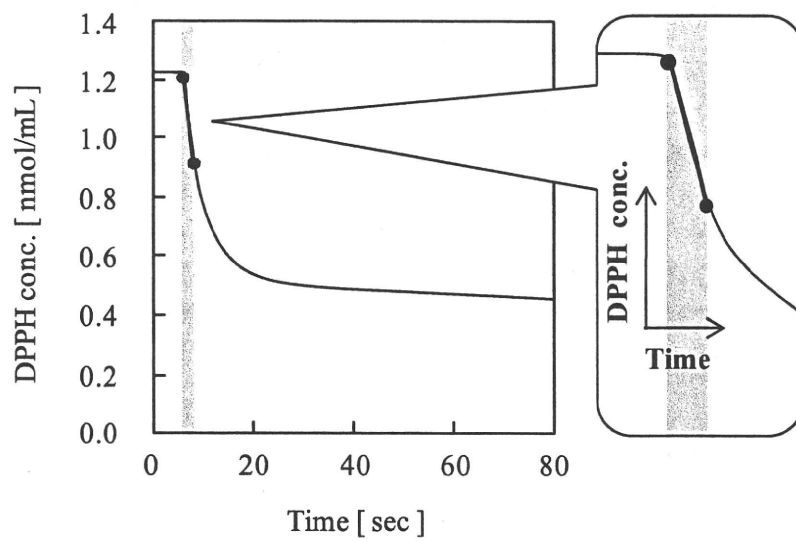
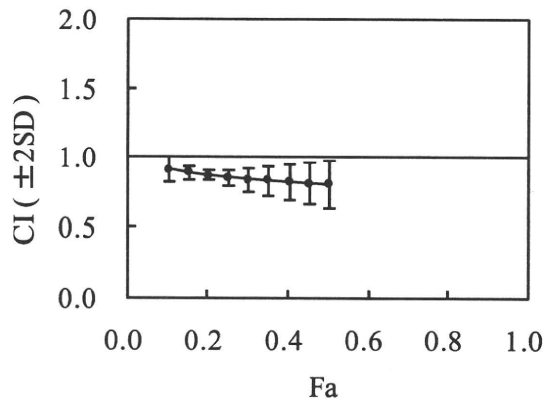


Fig. 2 ラジカル捕捉速度の算出

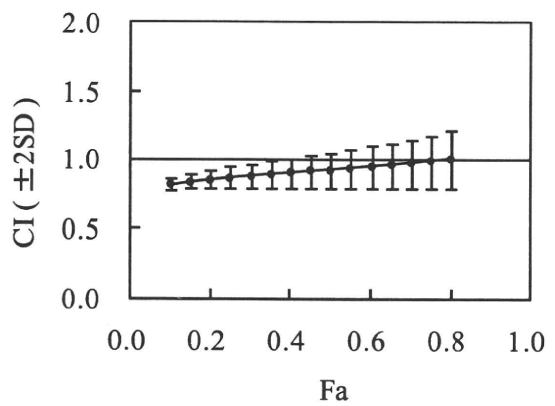
Table 1. 併用解析の結果

抗酸化物質	Median effect analysis	
	(ORAC)	(DPPH)
カテキン+ケルセチン	相乗	相加
フェルラ酸+エラグ酸	相乗	相殺
エラグ酸+没食子酸	相乗/相加	相加
ECg+ケルセチン	相乗/相加	相加
EGC+ケルセチン	相乗/相加	相加
EGCg+ケルセチン	相乗/相加	相乗
EC+ケルセチン	相加	相乗/相加

(a) 相乗効果 (カテキン+ケルセチン)



(b) 相乗/相加 (没食子酸+エラグ酸)



(c) 相加効果 (EC+ケルセチン)

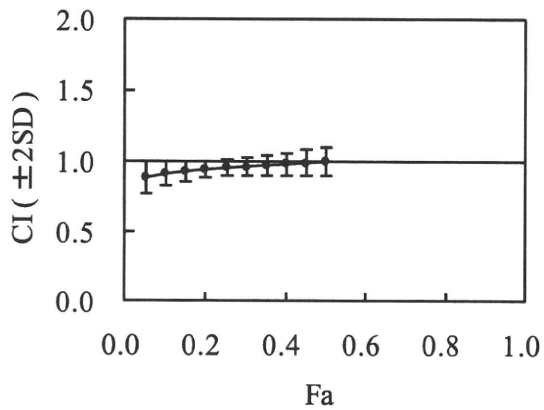


Fig. 3 CI plot

Table 2. 併用解析の結果及びラジカル捕捉速度

抗酸化物質	Median effect analysis による解析結果	ラジカル捕捉速度 × 10 <sup>3</sup> [U/mol]
モリン+エラグ酸	相乗	86.1 + 78.1
α-トコフェロール+ケルセチン	相乗	51.2 + 62.9
モリン+ケルセチン	相加/相乗	86.1 + 62.9
モリン+カテキン	相加/相乗	86.1 + 31.5
α-トコフェロール+モリン	相殺/相乗	86.1 + 51.2
フェルラ酸+エラグ酸	相殺	78.1 + 37.1
セサモール+エラグ酸	相殺	78.1 + 44.5
ケルセチン+没食子酸	相殺	62.9 + 57.4
フェルラ酸+没食子酸	相殺	57.4 + 37.1
カテキン+没食子酸	相殺	57.4 + 31.5
α-トコフェロール+カテキン	相殺	51.2 + 31.5
没食子酸+エラグ酸	相加	78.1 + 57.4
フェルラ酸+モリン	相加	86.1 + 37.1
カテキン+ケルセチン	相加	62.9 + 31.5
フェルラ酸+セサモール	相加	44.5 + 37.1
カテキン+セサモール	相加	44.5 + 31.5

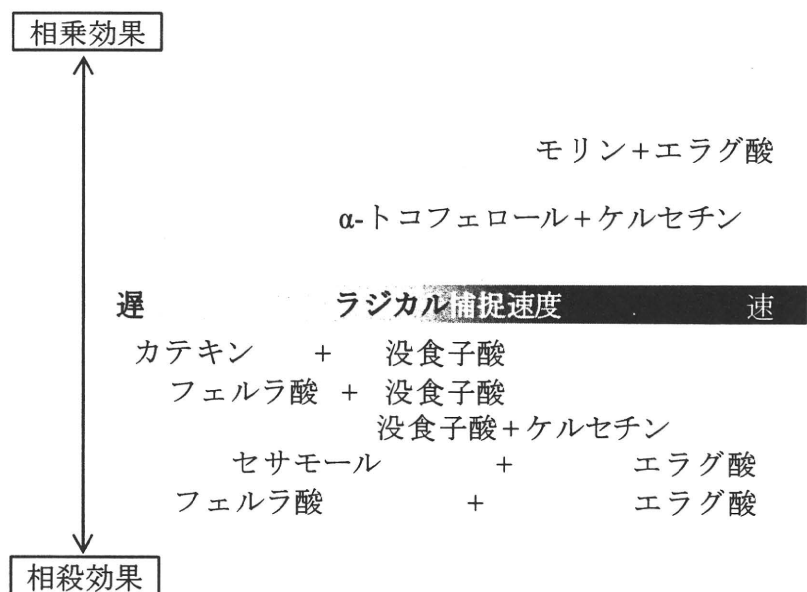


Fig. 4 併用効果及びラジカル捕捉速度

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 年度分担研究報告書

天然酸化防止剤の併用効果の解析法に関する研究

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 松井 利郎 九州大学農学部 准教授

研究協力者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

## 研究要旨

酸化防止剤の併用効果を判定するために、薬剤の併用効果判定に汎用されている Median effect analysis の適用性を 20、21 年度に引き続き検討した。本年度は、測定法として DPPH 法を用いて、まず疎水性酸化防止剤である  $\alpha$ -トコフェロールとの併用効果を 14 通りの組合せで検討した。その結果、ルチン及びケルセチンと併用した場合に相乗効果が認められた。また、アスコルビン酸、ケンフェロール、モリン、セサモールに関しては fa 値が高い、すなわち高濃度域で相乗効果が認められた。その他 8 通りの組合せでは、いずれも相加効果しか認められなかった。次に、前年までの研究で相殺効果を示す傾向が複数認められているエラグ酸を中心として、13 通りの組合せで併用効果を検証した。その結果、8 通りの組合せで相殺効果を示すことが判明した。 $\alpha$ -トコフェロール、ケンフェロール（高 fa 側）、及びカテキン類（EC, EGC, EGCg の高 fa 側）では相加効果であった。相殺・相乗効果を示す原因を明らかにするために、個々の DPPH ラジカル消去挙動を経時的に測定した結果、DPPH ラジカルとの反応速度が併用効果に大きな影響を与えている可能性が示唆された。

## 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を設定する上で、酸化防止剤の相互作用を評価することは極めて重要である。特に、既存添加物は天然由来の複雑な混合物である場合が多いが、天然物抽出物中の抗酸化物の活性は相加的に働くだけでなく、相互作用により強められたり弱められたりする場合がある。また、酸化防止剤を併用する場合には、使用時に相殺効果が生じた場合、期待される抗酸化効果が得られなくなるため重大な問題となる。

混合系における抗酸化物質間の相互作用は、予測された値（予測値）よりも実測値が大きければ相乗効果（synergistic effect）、小さければ相殺効果（antagonistic effect）、同等であれば相

加効果（additive effect）と判定されるが、判定基準となる予測値の見積もりは極めて難しい。混合系における抗酸化物質の活性予測値について、その算出方法、算出根拠を明確に論じた報告例は見当たらない。我々は、平成 17～19 年度厚生科学研究「天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究」において、抗酸化成分の併用効果の検討に使用された実績を有する Fractional product method<sup>1)</sup>を用いて酸化防止剤の併用効果の判定を試みた。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<sup>2)</sup>ことから、予測値  $I_E$  と実測値とを比較することにより、2 成分混合系における酸化防止剤の効果（相乗効果、相加効果、相殺効果）を検討して