

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 20～22 年度 総合研究報告書

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
	松本	清	九州大学大学院
	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

I.	総合研究報告書	
1.	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（総括）	1
	研究代表者：山崎 壮	
2.	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（分担研究）	17
	研究分担者：受田 浩之	
	研究分担者：松本 清	
	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 丈拡	
3.	天然酸化防止剤の併用効果の解析法に関する研究（分担研究）	21
	研究分担者：松井 利郎	
	研究分担者：石川 洋哉	
	研究分担者：松本 清	
	研究協力者：受田 浩之	
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(分担研究)	25
	研究分担者：杉本 直樹	
	研究分担者：多田 敦子	
	研究分担者：水上 元	
	研究協力者：田原 麻衣子	
	研究協力者：石附 京子	
	研究協力者：永津 明人	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV.	研究成果の刊行物・別刷	31

## 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。平成 20～22 年度の 3 年計画で以下の研究を行った。

### 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

- ・複数の抗酸化活性測定法（DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法、ORAC 法、 $\beta$ -カロテン退色法、TBA 法、ロダン鉄法）の既存添加物酸化防止剤への適用性を検証して操作法を改良するとともに、各測定値間の関連性を評価した。
- ・室間再現性のある抗酸化活性測定標準操作法の作成をめざして、DPPH 法のプロトコールを改良し、今年度は 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。DPPH 法を規格試験法に採用するための道が開けた。
- ・酸化防止剤の併用が活性測定値に与える影響を解析した。併用効果（相乗、相加、相殺）の解析法として、Median effect analysis が有用であった。一部の化合物の組み合わせでは相殺効果が認められることがわかった。また、DPPH 法による測定では、ラジカル消去速度が併用効果を生じる重要因子になっていることが示唆された。
- ・DPPH 法を使って、既存添加物ドクダミ抽出物製品(用途：酸化防止剤)中の各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化活性寄与率を算出した。

#### 2. 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

- ・ローズマリー抽出物とチャ抽出物の熱分解物には遺伝毒性が認められた。ブドウ種子抽出物の熱分解物には遺伝毒性が認められなかった。
- ・ローズマリー抽出物の熱分解では、アスコルビン酸の添加遺伝毒性物質の生成が抑制された。チャ抽出物およびその熱分解物にカタラーゼを添加すると、遺伝毒性が低下した。
- ・ローズマリー抽出物の熱分解によって生成した遺伝毒性物質のうちで最も生成量が多くまた最も強い遺伝毒性を示した成分がデヒドロロスマリキノンであると同定した。

#### 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

- ・既存添加物の中で保存料・日持ち向上効果があるとされている製品の抗菌・抗かび活性を、寒天培地法（ペーパーディスク法）と液体培地法でスクリーニングした。抗菌活性が認められない製品が複数存在した。

- ・抗菌活性成分の分画ミニカートリッジカラムが有用であった。
- ・ホコッシ抽出物の抗菌活性成分がバクチオールに由来することを確認し、製品中のバクチオールを定量した。

## 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 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可能であるという特長をもつので、既存添加物の分析に応用することをめざした。食品添加物製品および天然抽出物中の指標成分の定量、定量用試薬の純度測定、定量 NMR 多変量解析の応用として、次のことを実施した。

コチニール色素中の主色素成分カルミン酸の含量測定、ベニバナ赤色素製品に含まれる主色素成分カルタミンの含量測定、ソバ乾麺中のクエルセチン含量測定、クエルセチン配糖体を成分とする食品添加物と市販試薬の純度測定、セスキテルペンとアルカロイドを成分とする植物抽出物と市販試薬の純度測定、ステビア抽出物の規格試験に使用する定量用試薬の純度測定、カラメル規格試験に使用する定量用試薬の純度測定、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の検討。

## 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

次のことを実施した。

- ・各種イソアルファー酸異性体の LC/MS 分析法の確立と、既存添加物イソアルファー苦味酸製品、一般飲食物添加物ホップ抽出物製品および市販のホップ関連製品の基原の確認
- ・既存添加物ドクダミ抽出物とドクダミを基原とする生薬ジュウヤクの成分組成解析と基原の推定
- ・国内クワ栽培品種の標準植物の根皮乾燥物からの抽出物と既存添加物クワ抽出物製品および生薬ソウハクヒ製品の成分組成比較に基づく製品の基原植物種の考察
- ・既存添加物トウガラシ水性抽出物の含有成分の分析法の検討検と、製品の基原の考察

### (6) 食品用酵素の基原と確認試験法の開発

- ・8 品目の酵素 ( $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼ) について、国内で流通しているほぼすべてにあたる 103 試料を入手し、SDS-PAGE によりタンパク質分離パターンを分析した。多くの製品に関して基原によって特徴的な電気泳動パターンを示した。基原種と電気泳動パターンの関連に関する有用な情報が得られた。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。
- ・ $\alpha$ -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、ペプチド分析から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。
- ・SDS-PAGE とペプチド分析は、酵素の簡便な基原確認試験法として利用が期待できる。

#### D. 既存添加物の規格作成に向けての検討

##### 7. 既存添加物の規格作成に関する調査研究

自主規格の新規作成と既設定規格の見直し、自主規格の規格試験法の適合性再確認、EUにおける新たな食品酵素規制に関する調査研究、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

松本 清 九州大学大学院農学研究院  
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

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

水上 元 名古屋市立大学大学院薬学  
研究科 教授

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 丈広 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

伊藤 裕才 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 主任研究官

小林 晴美 埼玉県衛生研究所 水・食品  
担当部

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

高橋 仁一 日本食品添加物協会  
常務理事

白須 由治 日本食品添加物協会  
常務理事

(所属と役職は、参加時点のものを示した。)

## 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た。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った。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た。

## 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

#### 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

- ・約 30 種類の酸化防止剤製品を対象にして、各種抗酸化活性測定法の既存添加物酸化防止剤への適用性を検証した。ま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。
- ・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。

- ・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。

- ・酸化防止剤製品の抗酸化活性と含有成分の抗酸化活性寄与率を解析した。

#### 2. 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. 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 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。年度ごとに対象品目をかえて、食品添加物製品および天然抽出物中の指標成分の定量、定量用試薬の純度測定、定量 NMR 多変量解析の応用を検討した。

### 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った。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

##### 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

既存添加物に分類される酸化防止剤は天然由来の複雑な混合物である場合が多く、特定の指標成分または複数の指標成分の合計量で有効成分含量を規定して品質管理することが難しい。そこで、抗酸化力価に基づいた新たな有効性評価法を成分規格試験法に導入することが有効と考えられた。成分規格試験法に利用できる抗酸化活性測定標準操作法を確立するために検討を行った。

- 1) 各種抗酸化活性測定法の既存添加物酸化防止剤への適用性検証と、異なる抗酸化活性測定法の測定値間の関連性評価

各種抗酸化活性測定法(DPPH法、ABTS法、WST-1法、ORAC法、β-カロテン退色法、TBA法、ロダン鉄法)の酸化防止剤への適用性を検討した。さらに、異なる抗酸化活性測定法の測定値間の関連性(抗酸

化活性値の高低に関連性が認められるか)を評価した。

平成17～19年度の前事業において、ラジカル消去活性測定法であるDPPH法、ABTS法、活性酸素消去活性測定法であるWST-1法による酸化防止剤の抗酸化活性測定を行い、3法がいずれも酸化防止剤の力価評価に適用可能であることを報告していたが、この3法の測定値の高低には関連性が認められた。

ORAC法は、DPPH法あるいはABTS法の測定値の間には相関が認められたが、WST-1法の測定値の間には相関が認められなかった。また、ORAC法による酸化防止剤の力価評価は可能であるものの、脂溶性酸化防止剤への適用性の低さ、測定時間の長さ、再現性の低さなどの特徴を理解した上で慎重に取り扱う必要があると判断した(平20)。なお、ORAC法による疎水性酸化防止剤測定の適用性を広げるためには、溶解助剤としてランダムメチル化シクロデキストリン、反応溶媒としてAWA溶液(アセトン:超純水:酢酸=700:295:5)を使う組合せが有効であった(平21)。

DPPH法、ABTS法、WST-1法、ORAC法の反応系に脂質は用いられない。そこで、脂質過酸化抑制能評価法であるβ-カロテン退色法、チオバルビツール酸(TBA)法、ロダン鉄法による酸化防止剤の抗酸化活性測定を行った。β-カロテン退色法は酸化防止剤試料の色の影響を受けやすく、適用範囲が狭いことが判明した。TBA法は再現性が極めて低いことが判明した。これらのことから、この2法に関しては酸化防止剤への適用は困難であると判断した(平21)。ロダン鉄法は、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結果、酸化防止剤の脂質酸化

抑制能測定法として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成分規格試験法への採用は難しいと考えられた。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。(平22)。

## 2) 室間再現性のある抗酸化活性測定標準操作法の作成 —酸化防止剤力価試験法としてのDPPH法の室間共同試験—

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*- $\alpha$ -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。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。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。また、ORAC法の室間共同試験結果が報告されているが、DPPH法の室間再現性がORAC法よりも高いことが示された(平22)。

## 3) 酸化防止剤の併用が活性測定値に与える影響の解析

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(相乗、相加、相殺)とその作用機構を検討した。

### 3-1) 併用効果の解析手法の検討

従来は、抗酸化物の併用効果の検討に使用された実績を有するFractional product methodを用いて酸化防止剤の併用効果の判定を試行していたが、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、薬剤の併用効果解析法として用いられているMedian effect analysisを抗酸化食品成分併用効果の新規解析法として新たに検討した。複数の天然物酸化防止剤の組み合わせでDPPH法、WST-1法での併用効果を検討した結果、両法の判定結果は若干異なるものであったが、大きく異なるものではないと考えられた。しかし、酸化防止剤の組み合わせの中には互いの酸化防止剤が排他的(拮抗的)に作用していることが示唆されるものが見いだされた。この反応型は、Fractional product methodの適用条件に適合しないため、Fractional product methodは酸化防止剤の併用効果解析に適用不可能であることが判明した。Median effect analysisでは、実験結果を基に反応型を推定し、反応型に応じた併用効果の解析を行うため、汎用性が極めて高く、さらに濃度レベルに応じた判定も可能であることから酸化防止剤の併用効果の判定法として有力であると考えられた(平20~21)。

### 3-2) ORAC法での併用効果

Median effect analysisを用いて、ORAC法での併用性を評価した。ORAC法での解析結果は、DPPH法の結果とほとんど一致しないことが判明した。ORAC法は水素原子の転移反応に基づく測定法であり、DPPH法は一電子転移反応によるものであり、両者の反応機構が異なることに起因すると推測される(平22)。



### 3-3) DPPH 法での併用効果発現因子の解明

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。その結果、各酸化防止剤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。また、DPPH ラジカル消去反応において、平衡状態に至るまでのラジカル消去挙動全体に着目した場合、消去挙動が類似した抗酸化物の組合せで相乗・相殺効果が生じる可能性が高いことが明らかになった。以上より、酸化防止剤併用性の評価に対して、ラジカル消去過程での消去速度が重要な併用性発現因子となっていることが示唆された（平 22）。

### 4) 酸化防止剤製品の含有成分の抗酸化活性寄与率の解析

DPPH 法を既存添加物ドクダミ抽出物製品の抗酸化活性評価に応用した。含有成分である各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化活性寄与率を算出した。ドクダミ抽出物製品には抗酸化活性が認められたが、添加物製品の活性の約 20%が各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化活性により説明できることが明らかとなった（平 21）。

## 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

天然抗酸化剤の過剰摂取（主に健康食品素材として）による生体内有害作用が報告され、抗酸化剤がプロオキシダント作用を示す可能性が指摘されている。食品中でも

天然抗酸化剤の劣化や過剰使用により有害物質生成の可能性があり得るので、そ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ルになる。有害物質生成を防ぐための成分規格、使用基準、適正使用に資する基礎的情報を得ることができる。そこで、酸化防止剤を強制的に酸化劣化させ、*in vitro* 遺伝毒性を用いて有害物質生成の可能性を検討した。

### 1) ローズマリー抽出物

ローズマリー抽出物を光照射すると数多くの分解物が生成したが、未処理の時と同様に遺伝毒性を示さなかった。一方、熱分解物には遺伝毒性が認められた（平 20）。

ローズマリー抽出物ではアスコルビン酸の添加で遺伝毒性物質の生成が抑制された（平 21）。

ローズマリー抽出物の熱分解によって生成した遺伝毒性物質のうちで最も生成量が多くまた最も強い遺伝毒性を示した成分がデヒドロロスマリキノンであると同定した。カタラーゼの添加で遺伝毒性物質の生成が抑制された（平 22）。

### 2) チャ抽出物

チャ抽出物およびその熱分解物には遺伝毒性が認められた。チャ抽出物およびその熱分解物にカタラーゼを添加すると、遺伝毒性が低下した。チャ抽出物およびその熱分解物から過酸化水素が発生していることが示唆された（平 21）。

### 3) ブドウ種子抽出物

ブドウ種子抽出物およびその熱分解物には遺伝毒性が認められなかった（平 22）。

## 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・日持ち向上剤は、

抗菌もしくは静菌作用があるとされているが、市販製品の抗菌力と抗菌活性成分が不明確である上、有効性を担保する成分規格も設定されていない。そこで、流通製品の抗菌・抗かび活性（以下、抗菌活性）スクリーニングするとともに、活性成分を解析し、有効性を担保するための抗菌活性評価の指標成分を明らかにすることをめざした。

#### 1) 流通製品の抗菌・抗かび活性スクリーニング

既存添加物名簿秀才品目リスト注解書（日本食品添加物名簿）に抗菌作用もしくは静菌作用があると記載されている既存添加物のうち国内で流通のあるものを収集し、抗菌活性をスクリーニングした。精製水及び 80%メタノールで調製した試料液について、グラム陰性菌、グラム陰性菌、芽胞形成菌、酵母およびかびに対する抗菌活性を調べた。抗菌活性測定法としては、寒天培地法（ペーパーディスク法）と液体培地法を用いた。

寒天培地法では、ポリリシンは試験に供した 5 種類の試験菌に対して抗菌活性を示した。チャ抽出物、カンゾウ油性抽出物、カワラヨモギ抽出物、ホコッシ抽出物、クワ抽出物、ブドウ果皮抽出物が一部の試験菌に抗菌活性を示した（平 20）。液体培地法では、寒天培地法では抗菌活性が認められなかった、あるいは極めて弱かったしらこたん白抽出物、トウガラシ水性抽出物、ユッカフォーム抽出物も、一部の試験菌に抗菌活性を示した。液体培地法は寒天培地法に比べて、操作が煩雑で手間がかかるが、抗菌活性をより感度よく検出できた（平 21）。

#### 2) 抗菌・抗かび活性成分の解析

寒天培地法で活性が認められた品目のう

ち 4 品目（ポリリシン、チャ抽出物、カンゾウ油性抽出物、ブドウ種子抽出物）について、ミニカートリッジカラム（Oasis HLB）を用いて抗菌活性成分の分画を試みた。チャ抽出物とホコッシ抽出物はカラム保持分画（疎水性分画）に抗菌活性が見られた。ポリリシンカンゾウ油性抽出物、およびブドウ種子抽出物はカラム流出分画と保持分画の両方に抗菌活性が認められた（平 21～22）。

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 HPLC 法と抗菌活性を指標とした微生物学的試験法により定量した。両法で近似した値が得られた。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ことが確認された（平 22）。

#### 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) 食品添加物製品および天然抽出物中の指標成分の定量

コチニール色素中の主色素成分カルミン酸の含量測定、ベニバナ赤色素製品に含まれる主色素成分カルタミンの含量測定、ソバ乾麺中のクエルセチン含量測定、クエルセチン配糖体を成分とする食品添加物と市販試薬の含量(純度)測定、セスキテルペンとアルカロイドを成分とする植物抽出物中の指標成分の純度測定を行った(H20～22)。

なお、最近になって市販された定量 NMR 用基準物質 1,4-bis(trimethylsilyl)benzene (BTMSB) は SI トレサブルな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。しかし、ベニバナ赤色素の測定では BTMSB のシグナルと重なるシグナルを持つ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 で濃度較正した hexamethyldisilane (HMD) を用いた。この例のように試料由来のシグナルと重なる場合があり、NMR 基準物質の選択には注意が必要である。

#### 2) 定量用試薬の純度測定

「カラメル」の純度試験に用いる定量用試薬である 2-methylimidazole (2-MeI) 試薬、4-methylimidazole (4-MeI) 試薬および 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxy-butyl)imidazole (THI) の純度、「ステビ

ア抽出物」の定量用試薬であるステビオシドおよびレバウジオシド A 試薬の純度測定を行った(H22)。

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。

#### 3) 定量 NMR 多変量解析の応用

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、カラメル I 9 製品、カラメル III 4 製品、カラメル IV 7 製品を対象にして定量 NMR スペクトルの多変量解析を行い、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。

すべての試料において糖類に由来するシグナルが観察されると共に、試料ごとに特徴的なシグナルが観察され、製造方法、原料、性状に起因しているものと考えられた。NMR スペクトルの多変量解析を行うと、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。

なお、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  
国の成分規格が設定されていない品目を中心に、正しい基原と部位の原材料が使用されていることを確認するために有効な指標成分を明らかにし、その成分の分析手法を開発することをめざした。以下の事項を実施した。
- 1) 各種イソアルファ酸異性体のLC/MS分析法を新たに確立し、既存添加物イソアルファ酸苦味酸製品、一般飲食物添加物ホップ抽出物製品および市販のホップ関連製品を分析し、基原の確かさを確認した(H20)。
  - 2) 既存添加物ドクダミ抽出物とドクダミを基原とする生薬ジュウヤクを対象にして成分組成を解析した。ドクダミ抽出物の基原はドクダミ *H. cordata* であると推定された(H20)。
  - 3) 数種の国内クワ栽培品種の標準植物の根皮乾燥物から抽出物を調製して成分組成を調べ、既存添加物クワ抽出物製品および生薬ソウハクヒ製品の成分組成と比較し、製品の基原植物種を考察した。その際、LC/MSの16種の主要ピークのピーク面積を用いて主成分分析を行うと、各資料の成分組成の差を明瞭に検出することができた。既存添加物クワ抽出物製品の基原は、国内でマグワ *M. alba* とされている栽培品種またはその交雑種と推定された。中国産クワを原料とする生薬ソウハクヒ製品とは成分組成が異なった(H21)。
  - 4) 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。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(H21)。

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、食品酵素の品質確保の観点から製造企業の品質管理を監視するための手段を確保しておくために、基原酵素タンパク質を確認する方法を開発することをめざした。
- 1) 8品目の酵素について、国内で流通しているほぼすべてにあたる103試料を入手し、SDS-PAGEによりタンパク質分離パターンを分析した。多くの製品に関して基原によって特徴的な電気泳動パターンを示した。基原種と電気泳動パターンの関連に関する有用な情報が得られた。酵素の簡便な基原確認試験法として利用が期待でき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(平20~21)。
  - 2) 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。 $\alpha$ -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での分解産物およびendoproteinase Lys-Cでの分解産物のペプチド分析により、SDS-PAGEでは区別できなかった製品をグループ分けできることが明らかになった。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(平22)。

#### 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

既存添加物の成分規格の整備に向けて、業界（日本食品添加物協会）に依頼して、自主規格の新規作成と既設定規格の見直し、自主規格の規格試験法の適合性再確認、EUにおける新たな食品酵素規制に関する調査研究、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（平20～22）。

#### 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、聖歌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。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 平成20年度

- 1) 松藤寛、佐々怜一郎、本間友輝、宮島拓臣、山崎壮、受田浩之、島村智子、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)。

###### 平成21年度

- 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、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)。
- 3) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H. Quantitative determination of atractylon in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* by  $^1\text{H-NMR}$  spectrometry. *Journal of Natural Medicines*, 64(2), 161-166(2010)。
- 4) 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)。

[総説]

###### 平成22年度

- 5) 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]
- 6) 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

- たダット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).
- 7) 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]
  - 8) 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).
  - 9) 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).
  - 10) 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).
  - 11) 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  
平成 20 年度
    - 1) 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.
    - 2) 井邊早春, 石川洋哉, 受田浩之, 山崎壮, 松井利郎, 松本清: 酸化防止剤混合系における DPPH ラジカル消去活性測定と Median effect analysis による併用効果の判定. 第 46 回化学関連支部合同九州大会, 2009 年 7 月, 北九州 [発表予定]
    - 3) 杉本直樹, 古庄紀子, 建部千絵, 末松孝子, 内海博明, 多田敦子, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一: 核磁気共鳴に基づく食品添加物の新規定量法の開発. 日本食品化学学会第 14 回学術大会, 2008 年 5 月, 西宮.
    - 4) 杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一, 末松孝子, 内海博明, 齋藤 剛, 井原俊英, 小島 豊, 伊藤澄夫: qNMR を用いた天然色素カルミン酸の絶対定量. 日本生薬学会第 55 回年会, 2008 年 9 月, 長崎.
    - 5) 建部千絵, 杉本直樹, 齋藤 剛, 井原俊英, 末松孝子, 有福和紀, 内海博明, 吉田雄一, 多田敦子, 佐藤恭子, 山崎壮, 棚元憲一, 西村哲治: qNMR に基づく食用合成色素の新規定量法. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都.
    - 6) 石附京子, 多田敦子, 杉本直樹, 山崎壮, 棚元憲一: LC/MS/MS を用いたイソアルファー苦味酸およびホップ関連製品の分析. 日本食品衛生学会第 96 回学術講演会, 2008 年 9 月, 神戸.
    - 7) 多田敦子, 石附京子, 濱田ひかり, 小林義一, 山崎壮, 棚元憲一: 味認識装置に

- よる食品添加物イソアルファー苦味酸および含有苦味成分の測定. 日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月、福岡.
- 平成 21 年度
- 8) Saito, T., Yamada, Y., Yoshida, Y., Arifuku, K., Miura, T., Ihara, T., Suematsu, T., Tada, A., Sugimoto, N. Development of infrastructure for quantitative NMR. The 2nd International Meeting on NMR and Quantitative Analysis (2009.4).
  - 9) 多田敦子、杉本直樹、石附京子、末松孝子、有福和紀、齋藤剛、井原俊英、吉田雄一、山崎壮、西村哲治、棚元憲一、河村葉子. NMR による既存添加物中の quercetin 配糖体の定量. 食品化学学会 第 15 回総会・学術大会 (2009.5).
  - 10) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Yamazaki, T., Sato, K., Nishimura, T. Development of SI traceable quality control method for natural products based on qNMR. 50th ASP meeting (2009.6).
  - 11) 齋藤剛、三浦亨、井原俊英、前田恒昭、杉本直樹、多田敦子、西村哲治、有福和紀、末松孝子、山田裕子、吉田雄一. NMR を利用した有機化合物の定量における精確な秤量の重要性. 76 回日本分析化学会 有機微量分析研究懇談会シンポジウム (2009.6).
  - 12) 井邊早春、石川洋哉、受田浩之、山崎壮、松井利郎、松本清. 酸化防止剤混合系における DPPH ラジカル消去活性測定と Median effect analysis による併用効果の判定 第 46 回化学関連支部合同九州大会 (2009.7、北九州).
  - 13) 井邊早春、石川洋哉、受田浩之、山崎壮、松井利郎、松本清. Median effect analysis による酸化防止剤混合系における併用効果の判定 日本食品科学工学会 第 56 回大会 (2009.9、名古屋).
  - 14) Tada, A., Sugimoto, N., Takahashi, K., Ishizuki, K., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Yamazaki, T., Nishimura, T., Kawamura, Y. Determination of the contents of quercetin glucosides in natural food additives by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. 123rd AOAC Annual Meeting (2009.9).
  - 15) Akiyama, T., Sasaki, R., Yamagata, K., Tanamoto, K., Yamazaki, T., Kawamura, Y. Identification of origins of food manufacturing enzymes. The 123rd AOAC Annual Meetings (2009.9).
  - 16) 石附京子、多田敦子、高橋加奈、杉本直樹、松本清、受田浩之、松藤寛、山崎壮、河村葉子. LC/MS による既存添加物ドクダミ抽出物中の成分の定量と抗酸化活性測定. 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会 (2009.10、函館).
  - 17) 多田敦子、石附京子、小山朗夫、深井俊夫、秋山卓美、山崎 壮、河村葉子、既存添加物クワ抽出物中の成分と基原の検討. 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会 (2009.10、函館).
  - 18) 羽佐田桂子、永津明人、吉田貴光、水上元、山崎壮、杉本直樹、西村哲治. qNMR を利用した朮類生薬に含まれる atractylon の非分離定量. 日本生薬学会 第 56 回年会 (2009.10).
  - 19) 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、山崎壯、河村葉子、西村哲治。定量 NMR を用いた天然有機化合物の絶対定量法の開発。第 51 回天然有機化合物討論会 (2009.10)。
- 20) 杉本直樹、多田敦子、田原麻衣子、久保田領志、清水久美子、佐藤恭子、山崎壯、河村葉子、西村哲治。qNMR に基づく有機標準品の品質管理法の開発。第 46 回全国衛生化学技術協議会年会(2009.11)。
- 21) 三浦 亨、齋藤 剛、井原俊英、小池昌義、前田恒昭、杉本直樹、多田敦子、西村哲治、有福和紀、末松孝子、山田裕子、吉田雄一。NMR を利用して有機化合物を定量する場合の解析条件が定量値に与える影響に関する研究。第 48 回 NMR 討論会 (2009.11)。
- 22) 吉田貴光、羽佐田桂子、水上元、永津明人、山崎 壯、杉本直樹、西村哲治。qNMR によるオウレン中のベルベリンアルカロイド類の定量。第 38 回生薬分析シンポジウム (2009.12)。
- 平成 22 年度
- 23) 隅倉功大、山崎壯、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 (2010.9, 東京)。
- 24) 隅倉功大、吉田鉄平、島村智子、柏木丈弘、山崎壯、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 (2011.3, 京都)。
- 25) 松藤寛、丸山千明、高橋明日香、千野誠、山形一雄、山崎壯：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 (2011.5) [発表予定]。
- 26) 大槻崇、杉本直樹、多田敦子、建部千絵、末松孝子、有福和紀、山崎壯、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)。
- 27) 三浦亨、齋藤剛、井原俊英、前田恒昭、杉本直樹、多田敦子、山崎壯、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)。
- 28) 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、山崎壯、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)。
- 29) 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 壯、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)。
- 30) 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)。
- 31) 河野桂子、吉田貴光、杉本直樹、山崎壯、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 (2011.5) [発表予定]。
- 32) 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 壯、河村葉子：ステビオシドおよびレバウジオシド 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 (2010.9, 熊本) .

33) 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 (2010.9, 熊本) .

34) 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 (2010.9, 熊本) .

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

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 20-22 年度分担総合研究報告書

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 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 松本 清 九州大学大学院農学研究院 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抗酸化力価に基づく新たな評価法を規格基準法（公定法）として適用することを目的とした研究を実施した。まず、各種抗酸化活性測定法（DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法、ORAC 法、ロダン鉄法、 $\beta$ -カロテン退色法、TBA 法）の酸化防止剤への適用性を検討し、その結果から公定法の候補として DPPH 法を選択した。DPPH 法に関しては分析法の妥当性確認を行うために、14 試験室による共同試験を実施した。その結果、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妥当性の確認ができたことから、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。

#### 研究成果の総括

既存添加物に分類される酸化防止剤は、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。そこで、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（公定法）として適用する必要があると考えられている。

平成 17-19 年度の前事業において、ラジカル消去活性測定法である 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法と 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) 法による酸化防止剤の抗酸化活性測定を行い、上記 3 法がいずれも酸化防止剤の力価評価に適用可能であることを報告した。

平成 20-22 年度の本事業においては、引き続き、主要抗酸化活性評価法の酸化防止剤への適用性を調べるとともに、公定法の候補を選び出し、共同試験による妥当性確認を行った。

まず、活性酸素消去活性測定法である oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法による酸化防止剤 35 種類の抗酸化活性測定を行った。その結果、23 種類の酸化防止剤について ORAC 値、すなわち抗酸化活性を求めることが可能であった。しかし、脂溶性酸化防止剤については、溶解に用いる溶媒により ORAC

値が変動するなどの問題点が見られた。また、再現性に関しては、先に適用性が確認された3法と比較して低い傾向にあった。以上のことから、ORAC法による酸化防止剤の力価評価は可能であるものの、脂溶性酸化防止剤への適用性の低さ、測定時間の長さ、再現性の低さなどの特徴を理解した上で慎重に取り扱う必要があると判断した。

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、酸化防止剤の重要な目的のひとつは、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。そこで本事業では、代表的な脂質過酸化抑制能評価法である $\beta$ -カロテン退色法、チオバルビツール酸 (TBA) 法、ロダン鉄法による酸化防止剤の抗酸化活性測定を行った。

その結果、 $\beta$ -カロテン退色法は酸化防止剤試料の色の影響を受けやすく、適用範囲が狭いことが判明した。また、TBA法は再現性が極めて低いことが判明した。これらのことから、この2法に関しては酸化防止剤への適用は困難であると判断した。

ロダン鉄法に関しては、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後、酸化防止剤の抗酸化活性測定を行った。その結果、改良ロダン鉄法を用いることにより35種類中、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おいては、試験室間の共同試験が最も有効であるとされている。そこで本事業では、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。なお、本共同試験では、室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ )/室内再現相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) $\leq 2$ の基準を妥当性確認の指標として用いることとした(以下、 $RSD_R/RSD_r$ をRSD比と表記する)。

各試験室から報告された吸光度の値と $IC_{50}$ の値についてRSD比を求めたところ、吸光度値を用いた場合、エンジュ抽出物(80 $\mu$ g/mLの1点)とトロロックス(全試験濃度)でRSD比 $\leq 2$ 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。この原因の一つとして、試験室間の吸光度値の偏りが考えられた。また、試験室間での試料秤取量の僅かな差が影響した可能性も否定できないと考えられた。一方、 $IC_{50}$ 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。 $IC_{50}$ に基づくRSD比を求めた結果、トロロックスとエンジュ抽出物では

RSD 比 $\leq 2$ の基準を満たした。また、*d*- $\alpha$ -トコフェロールの測定に関しては、RSD 比 $\leq 2$ 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、ブドウ種子抽出物の RSD 比は 2 を超えていた。これには、酸化防止剤自体の吸湿性の高さなどの影響があるものと推察された。しかし、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。

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。