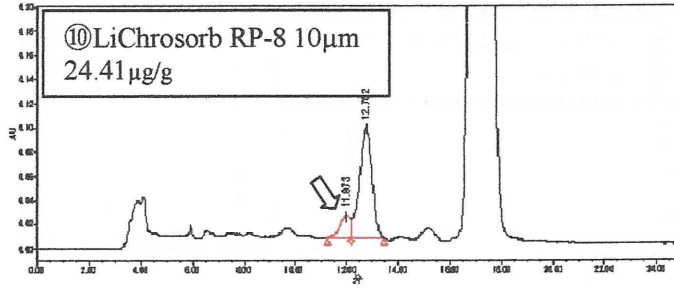
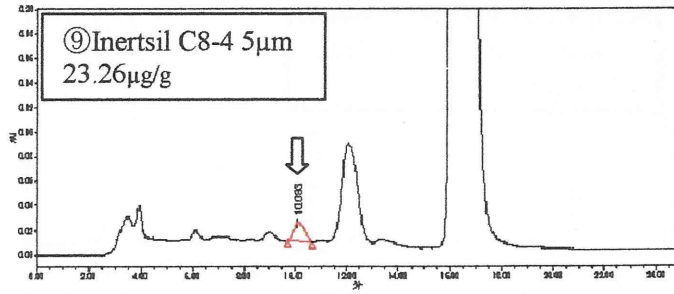
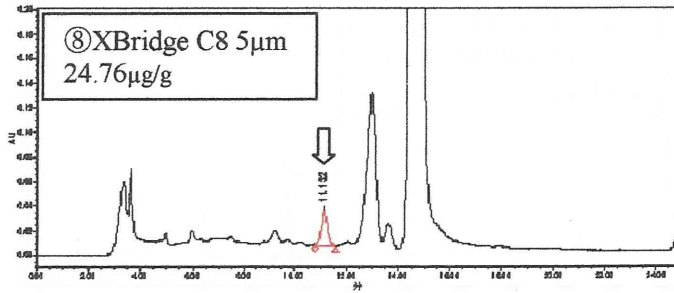
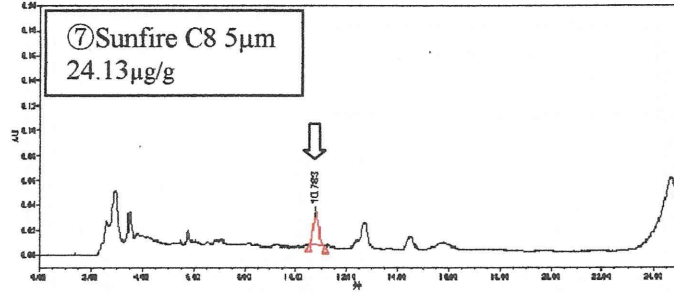
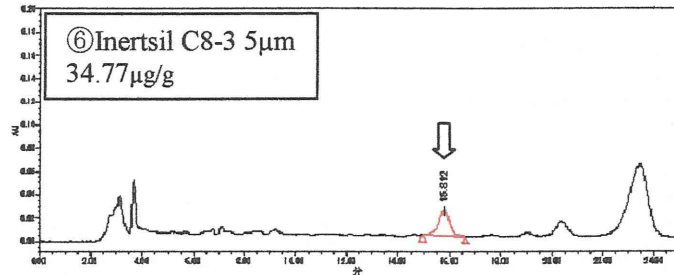


図 5. オクチルカラムによる検液の分析. カラム名称, 粒子径および THI-DNPH 含量を示した. THI-DNPHピークを矢印で示した. カラムサイズ: 4.6 mm I.D. \times 250 mm. 溶媒: 0.1mol/Lリン酸/メタノール混液 (68 : 32).



☒ 5 (continued).

Ⅱ. 分担研究報告書

4. 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

- 4.1. シークエンシャルインジェクション分析 (SIA) 法による脂質過酸化抑制能評価法の開発
- 4.2. チャ抽出物中の成分含量と抗酸化力価との関連
- 4.3. 酸化防止剤力価評価における DPPH 法と ABTS 法における反応特性の検証と酸化防止剤の併用効果の解析に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 23 年度分担研究報告書

シークエンシャルインジェクション分析（SIA）法による脂質過酸化抑制能評価法の開発

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 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 柏木丈拓 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 食品科学分野で長年用いられてきた抗酸化活性評価法には、活性酸素やラジカル種の消去活性を評価する手法のほか、リノール酸などを反応系に使用する手法（脂質過酸化抑制能評価法）が存在する。昨年度、本事業において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い、酸化防止剤35種類中32種類の力価評価を可能とした。しかし、バッチ法のロダン鉄法は、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汎用性の高い方法とは言い難かった。そこで本年度は、シークエンシャルインジェクション分析（Sequential injection analysis: SIA）法をロダン鉄法に適用し、測定時間の短縮、ならびに測定の自動化を試みた。SIA法の各種測定条件を最適化後、代表的な抗酸化物質10種類の脂質過酸化抑制能評価を行ったところ、全ての試料においてIC₅₀とTEACを求めることが可能であった。また、SIA法と従来法であるバッチ法で得られた結果との間に有意な相関が認められた。以上のことから、今回開発したSIA法が抗酸化物質の脂質過酸化抑制能評価に実用的に利用可能であることが示された。今後、既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価を本SIA法にて行う予定である。

A. 研究目的

食品科学分野で長年用いられてきた抗酸化活性評価法には、活性酸素やラジカル種の消去活性を評価する手法のほか、リノール酸などを反応系に使用する手法（脂質過酸化抑制能評価法）が存在する。昨年度、本事業において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い、酸化防止剤 35 種類中 32 種類の力価評価を可能とした。しかし、バッチ法のロダン鉄法は、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汎用性の高い方法とは言い難かった。そこで本年度は、シークエンシャルインジェクション分析（Sequential injection analysis: SIA）法の脂質過酸化抑制能評価への適用を試みた。

SIA法は、コンピューターで制御されるシリ

ンジポンプ、及びセレクションバルブを用いて、試料溶液と試薬溶液を順次ホールディングコイル内に注入し、混合を行い、反応生成物を検出器に導き測定を行う方法である。過去に、連続流れ分析法（FIA法）を過酸化脂質の検出に適用した例は存在するが²⁾、SIA法への適用例は我々の知る限り存在しない。従って、本研究では、脂質過酸化とロダン鉄法の2つの反応ステップをSIA法に適用し、測定時間の短縮、ならびに測定の自動化を試みた。

B. 研究方法

(1) 試薬

6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)、リノール酸、

2,2'-azobis(2-methylpropion-amidine) dihydrochloride (AAPH) は Aldrich 製を用いた。Tween 40、Tween 20、塩化鉄(II)、チオシアン酸アンモニウム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 Ω·cm の MilliQ 水を用いた。

(2) SIA 法

SIA 装置の概略を図 1 に示し、タイムプログラムを表 1 に示した。なお、表 1 に示したプログラム中の試薬吸引のシーケンス、試薬濃度、反応温度、吸引量は本研究において最適化したものである。脂質にはリノール酸を使用し、脂質過酸化物の検出にはロダン鉄法の原理を利用した。試料の阻害率は下記の式で算出した。式中の Ac は試料の代わりに試料溶媒を添加した際のピーク高、As は試料添加時のピーク高を意味している。

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

50%阻害を与える試料溶液の濃度を IC₅₀ とした。同様の手順にて、標準物質である Trolox の IC₅₀ を求めた。Trolox の IC₅₀ と試料の IC₅₀ 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。測定は 2 回以上繰り返し、結果はその平均で示した。

TEAC =

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

(3) ロダン鉄法 (バッチ法)

ロダン鉄法のバッチ法は下記の手順で行っ

た。脂質としてリノール酸を使用し、界面活性剤 Tween 40 と混合したリノール酸混合溶液を調製した。具体的には、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 μL、0.1%リノール酸混合溶液 1 mL、100 mM AAPH 200 μL、試料溶液 800 μL を順次添加し攪拌した後、37°C で正確に 15 分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 μL、30%チオシアン酸アンモニウム水溶液 100 μL、3.5%塩酸溶液で調製した 20 mM 塩化鉄(II)溶液 100 μL 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。塩化鉄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を添加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。

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

また、SIA 法と同様、Trolox を標準物質として各試料の TEAC を算出した。測定は 2 回以上繰り返し、結果はその平均で示した。

C. 研究結果と考察

(1) SIA 法による脂質過酸化抑制能評価

SIA 法によるリノール酸の脂質過酸化抑制能評価を行うにあたり、まず試薬吸引のシーケンス、試薬濃度、反応温度、吸引量の最適化を行い、最終的に表 1 に示した条件を設定した。本条件において標準物質である Trolox を用い

た試験を行ったところ、濃度依存的なピーク高の減少、すなわち阻害率の上昇が認められた(図2)。

そこで、代表的な抗酸化物質10種類(フェルラ酸、没食子酸、バニリン酸、アスコルビン酸、トコフェロール、セサモール、ケルセチン、モリン、カテキン、エラグ酸)の脂質過酸化抑制能評価を試みた。その結果、すべての抗酸化物質の IC_{50} を求めることが可能であった。表2に本SIA法で求めた各抗酸化物質の IC_{50} とTEACを示した。

(2) バッチ法との比較

先の結果より、本SIA法において代表的な抗酸化物質の脂質過酸化抑制能評価が可能であることが明らかとなったことから、続いて、従来数多くの研究で用いられてきたバッチ法のロダン鉄法との結果の比較を行った。なお、今回のバッチ法では脂質酸化の時間を15分とした。両測定法で得られた IC_{50} の回帰分析を行ったところ、両者の間の相関係数は0.993($n=10$)、回帰式は $y = 0.7282x + 2.1578$ となった。また、両測定法で得られたTEACの回帰分析も行ったところ、相関係数は0.880($n=10$)、回帰式は $y = 1.5809x - 0.033$ となった。いずれの場合も有意な相関が認められたことから、本研究で開発した脂質過酸化抑制能評価を目的としたSIA法は、抗酸化物質の力価評価に

実用的に利用可能であることが明らかとなった。

D. 結論

本研究の成果により、抗酸化物質の脂質過酸化抑制能評価をSIA法で行うことが可能となった。本SIA法は1時間あたり5-6検体の測定が可能である上、操作はほぼ自動化されている。また、従来法と比較して再現性も高かったことから、今回開発したSIA法は抗酸化物質の力価評価に実用的に利用可能であると考えられた。今後は、既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価を本SIA法にて行う予定である。

E. 参考文献

- 1) 高柳他, ぶんせき, **385**, 31 (2007).
- 2) 島村, *J. Flow Injection Anal.*, **28**, 150 (2011).

F. 研究発表

- (1) 論文発表
なし。
- (2) 学会発表
なし。

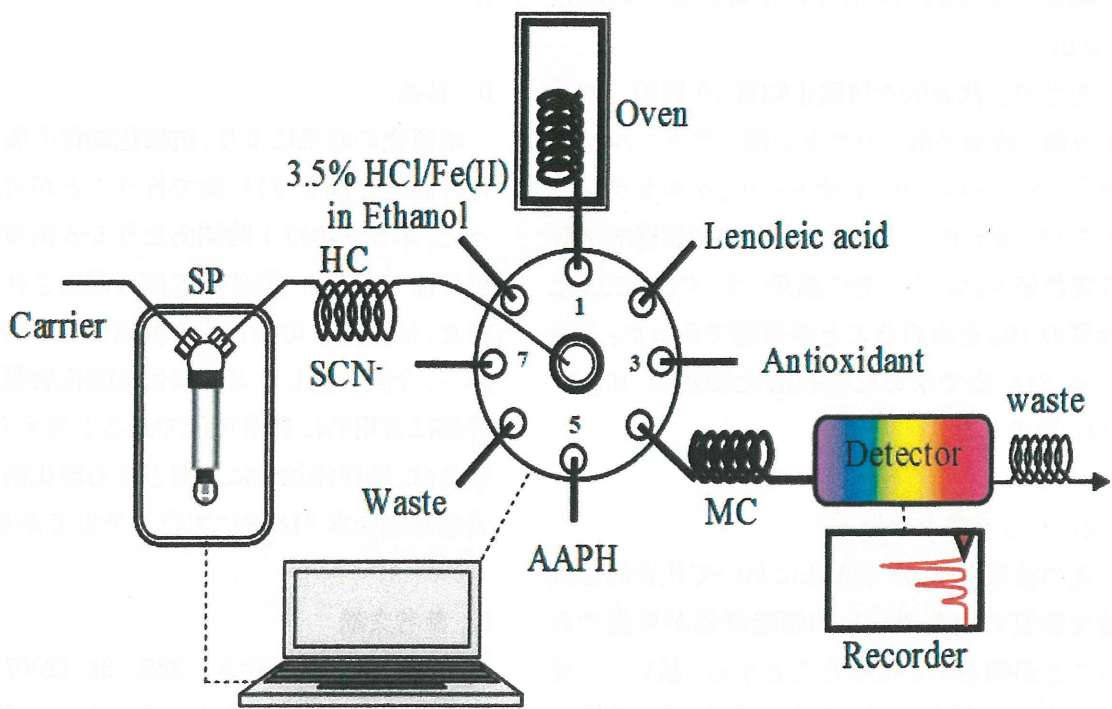


図1 SIA装置の概略

Carrier, 0.2% (w/v) Tween 20; SP, syringe pump; MC, mixing coil (400 cm, 0.8 mm i.d.)

表1 SIA法のタイムプログラム

Step	Operation	Syringe pump	Port	Volume (μL)	Flow rate (μL/sec)
Oxidation of linoleic acid (LA)					
1	Aspirate air		1	100	50
2	Aspirate 30 mM AAPH to holding coil		5	50	50
3	Aspirate antioxidant to holding coil		3	50	50
4	Aspirate 30 mM AAPH to holding coil		5	50	50
5	Aspirate antioxidant to holding coil		3	50	50
6	Aspirate 0.15% (w/v) LA to holding coil	In	2	200	50
7	Dispense aspirated solution to reactor coil (oven)		1	40	200
8	Flow reversal 3 times		1	-	-
9	Incubate reaction solution at 50°C for 3 min		1	-	-
10	Aspirate air and reaction solution containing LA-OOH to holding coil		1	150	50
11	Aspirate carrier to syringe pump and holding coil	Out	-	2350	500
12	Dispense to waste	In	6	Empty	500
Detection of LA-OOH					
13	Aspirate 4% (w/v) NH ₄ SCN to holding coil		7	50	50
14	Aspirate 2.5 mM FeCl ₂ to holding coil		8	50	50
15	Aspirate LA-OOH to holding coil	In	1	100	50
16	Aspirate 2.5 mM FeCl ₂ to holding coil		8	50	50
17	Aspirate 4% (w/v) NH ₄ SCN to holding coil		7	50	50
18	Aspirate carrier to syringe pump	Out	-	2200	500
19	Dispense reaction solution to detector		4	Empty	50
20	Aspirate solution to holding coil	In	1	500	50
21	Dispense to waste		6	Empty	500
Cleaning (repeated 3 times)					
22	Aspirate carrier to syringe pump	Out	-	2000	500
23	Dispense carrier to reactor coil (oven)		1	1000	300
24	Aspirate solution to holding coil	In	1	2500	50
25	Dispense solution to waste		6	Empty	500

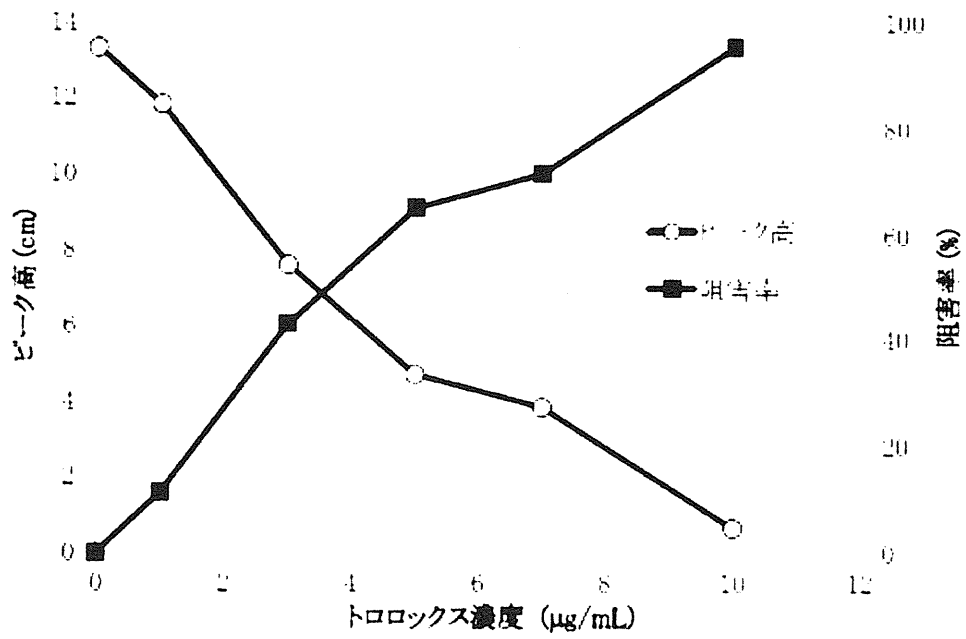


図2 SIA法により評価したTroloxの脂質過酸化抑制能

表 2 SIA 法により評価した各種抗酸化物質の脂質過酸化抑制能

抗酸化物質	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TEAC
フェルラ酸	9.81	0.38
没食子酸	33.3	0.11
バニリン酸	93.0	0.041
アスコルビン酸	125	0.030
トコフェロール	8.43	0.37
セサモール	18.4	0.17
ケルセチン	8.91	0.35
モリン	5.90	0.52
カテキン	8.36	0.37
エラグ酸	8.51	0.36

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 23 年度分担研究報告書

チャ抽出物中の成分含量と抗酸化力価との関連

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

研究分担者 松井利郎 九州大学大学院農学研究院 教授

研究分担者 石川洋哉 福岡女子大学国際文理学部 准教授

研究協力者 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

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 既存添加物は天然由来の複雑な組成を有しており、有効成分の網羅的解明が困難である場合が多い。従って、酸化防止剤の場合、抗酸化力価に基づく品質規格の設定が検討されている。これまでに本事業では、抗酸化力価評価法の公定法候補として DPPH 法を選抜し、室間共同試験による分析法の妥当性確認を実施した。そこで本研究では、有効成分、及び有効成分組成の特定が困難である既存添加物の品質規格として DPPH 法を公定法とする抗酸化力価を設定することを最終目標として、研究を進めた。本年度は、その準備段階として、既存添加物の中では比較的組成の解明と成分定量法の開発が進んでいるチャ抽出物を対象とし、成分含量と抗酸化力価との関連について調べた。その結果、測定に供した 30 種類のチャ抽出物のうち 29 種類で抗酸化力価を求めることが可能であった。また、今回定量を行った 8 種類のカテキン類（C、EC、GC、EGC、Cg、ECg、GCg、EGCg）は、全てチャ抽出物の抗酸化活性の発現に寄与しており、これらのカテキン類の抗酸化活性への寄与率は全体の約 93%であることを明らかとした。残り 7%の未知成分の寄与については検討の余地があるものの、本研究の結果より、有効成分含量と抗酸化力価との間に有意な相関（ $r = 0.982$, $n = 29$ ）を見出すことができた。本成果は、従来の成分量を用いた品質規格に代わり、DPPH 法を公定法とする抗酸化力価を品質規格として設定する上で、重要な根拠になると考えられた。

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-sulphonic 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、昨年度、室間共同試験によるプロトコルの妥当性確認を行った。この結果を踏まえ本研究では、有効成分、及び有効成分組成の特定が困難である既存添加物の品質規格として、DPPH 法を公定法とする抗酸化力価の設定を最終目標として検討を行った。本年度は、その準備段階として、既存添加物の中では比較的組成の解明と成分定量法の開発が進んでいるチャ抽出物を対象とし、成分含量と抗酸化力価との関連について調べた。

B. 研究方法

(1) 試薬

チャ抽出物 30 種類 (サンプル番号 1~30) を測定試料として使用した。6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は Aldrich 製を用いた。DPPH、エピカテキン (EC)、ガロカテキン (GC)、カテキンガレート (Cg)、エピカテキンガレート (ECg)、ガロカテキンガレート (GCg) は和光純薬工業製を、カテキン (C) は

東京化成工業製を、エピガロカテキン (EGC)、エピガロカテキンガレート (EGCg) はナカライテスク製を使用した。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。

(2) DPPH ラジカル消去活性測定

2-1. DPPH 溶液調製方法

最小表示が $10 \mu\text{g}$ 、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 $200 \mu\text{L}$ 、 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) $800 \mu\text{L}$ を順次加えて混合し、 517 nm の吸光度を測定した。吸光度測定のブランク溶液には、エタノール 1.2 mL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) $800 \mu\text{L}$ 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。

2-2. 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 $200 \mu\text{L}$ と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH

7.4) 800 μ L 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。吸光度測定のパラック溶液には 99.5% エタノール 1.2 mL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μ L 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。測定は 3 回繰り返した。

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。

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

2-3. IC₅₀ の算出方法

各試料の IC₅₀ 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。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。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 IC₅₀ (μ g/mL) とした。

2-4. Trolox 等価活性算出方法

試料の IC₅₀ が Trolox の IC₅₀ と同一の活性を有しているとみなし、各試料の DPPH ラジカル消去活性を Trolox 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。

TEAC =

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

(2) カテキン類の定量

チャ抽出物中のカテキン類の定量は HPLC にて行った。分析条件は下記の通りであった。機器：Waters LC-MS システム、カラム：CAPCELL PAK C18 UG120 S3 (4.6 i. d. \times 100 mm)、移動相：(A) 0.1%ギ酸水溶液、(B) 0.1%ギ酸を含むメタノール - アセトニトリル (4:1)、流速 0.5 mL/min、温度：40°C、グラジエントプログラム：0 分、5%(A)、2.5 分、16%(A)、17.5 分、31%(A)、検出波長：210 nm、280 nm (PDA: 190-600 nm)。

C. 研究結果と考察

(1) チャ抽出物の抗酸化力価

チャ抽出物 30 種類の抗酸化力価を DPPH 法により評価したところ、サンプル番号 30 番 (ウーロン茶抽出物) を除く 29 種類で TEAC を求めることが可能であった (図 1)。今回測定に用いたチャ抽出物の TEAC は 0.41~2.96 であった。この結果から、チャ抽出物として市販されている酸化防止剤でも、その抗酸化力価には差があることが判明した。

(2) チャ抽出物中のカテキン類含量

一般的にチャの抗酸化活性にはカテキン類の関与が大きいことが知られている。そこで本研究では、チャ抽出物の抗酸化活性の発現に寄与している可能性の高い 8 種類のカテキン類 (C、EC、GC、EGC、Cg、ECg、GCg、EGCg) の定量を行った (図 2)。サンプル番号 30 番 (ウーロン茶抽出物) 中のカテキン類は極僅かであり、本測定では検出することができなかった。また、サンプル番号 15-17 番 (紅茶抽出物) 中のカテキン類含量は、非常に少ないことが判明した。EGCg 濃縮物として市販されているサンプル番号 1、2、26、27 番のチャ抽出物では、

その組成の大部分を EGCg が占めていた。緑茶を熱湯抽出し、その熱水可溶分からカテキン以外の成分を除去して得た「茶カテキン」中のカテキン組成を分析すると、その 50%以上が EGCg であり、次いで EGC、ECg の順で高い含量を示すとの報告が存在する¹⁾。今回測定を行ったチャ抽出物でも先に示した特殊なもの以外は、EGCg、EGC、ECg がその組成において高い割合を占めており、製品に加工された後でも一般的な緑茶のカテキン類組成の特徴を有していることが判明した。また一般的に、発酵度の高いウーロン茶や紅茶のカテキン含量は緑茶と比較して低いことが知られており、本研究でも同様の結果となった。

(3) 抗酸化力価の実測値と予測値の比較

続いて、カテキン標品の抗酸化力価を DPPH 法で求め (表 1)、その値をもとに各種チャ抽出物の抗酸化力価の予測値を算出した。抗酸化力価の予測値は、各カテキン類の TEAC にチャ抽出物における各カテキン類の含有量を乗じ、全ての値を総和することで求めた。

上記 (1) で求めた各種チャ抽出物の実測値と予測値の間で回帰分析を行い、各種カテキン類の抗酸化活性への寄与率を調べた (表 2)。仮に、今回定量を行ったカテキン類の中にチャ抽出物の抗酸化活性の本体、すなわち抗酸化活性への寄与率が 100%のものが存在していた場合、実測値と予測値との間の回帰式の傾きは 1 になると考えられた。解析の結果、今回定量を行った 8 種類のカテキン類の中では、含有量の高い EGCg が最も高い寄与率を示すことが判明した。また、ガレート型カテキンのみの組み合わせで約 85%の寄与率があることも明らかとなった。表 2 を見て明らかのように、カテキ

ン類の組み合わせを増やすのに伴い、相関係数、ならびに寄与率が上昇する傾向が認められた。最終的に 8 種類全てを組み合わせた場合に最も高い相関係数が認められ、その値は 0.982 であった。また、その場合の寄与率は約 93%であった。この結果より、今回定量を行ったチャ抽出物中のカテキン類は全て抗酸化活性への寄与を示す有効成分であることが判明した。またこれらのカテキン類は、相加的に作用している可能性が高いと考えられた。

D. 結論

今回定量を行った 8 種類のカテキン類 (C、EC、GC、EGC、Cg、ECg、GCg、EGCg) は、全てチャ抽出物の抗酸化活性の発現に寄与しており、これらのカテキン類の抗酸化活性への寄与率は全体の約 93%であること明らかとした。残り 7%の未知成分の寄与については検討の余地があるものの、本研究の結果より、有効成分含量と抗酸化力価との間に有意な相関を見出すことができた。本成果は、従来成分量を用いた品質規格に代わり、DPPH 法を公定法とする抗酸化力価を品質規格として設定する上で、重要な根拠になると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 原, 日本食品保蔵科学会誌, **26**, 47 (2000).

F. 研究発表

- (1) 論文発表
なし。
- (2) 学会発表
なし。

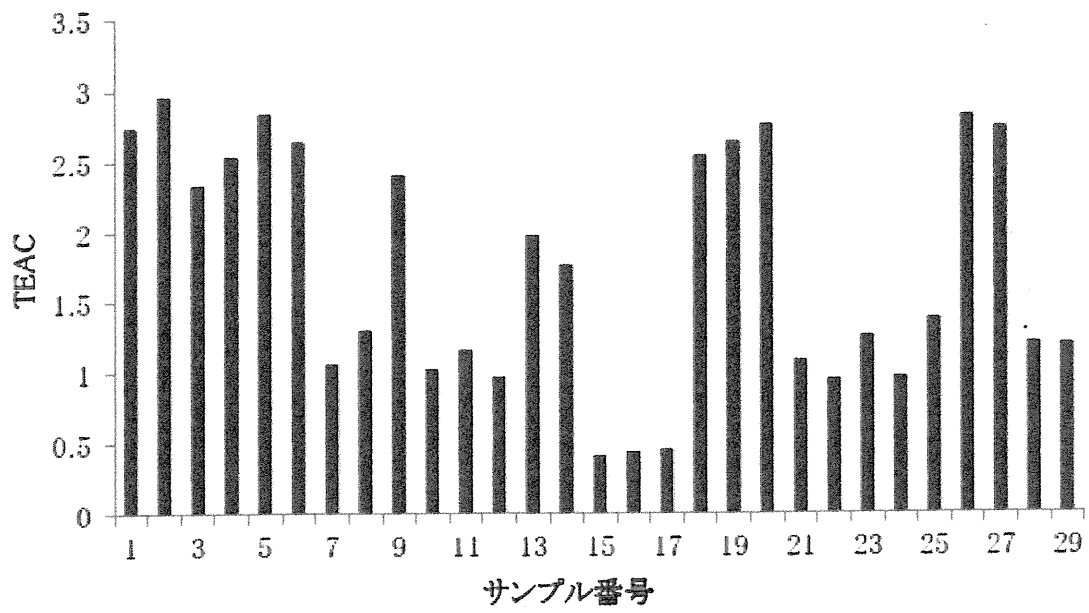


図1 チャ抽出物の抗酸化活性

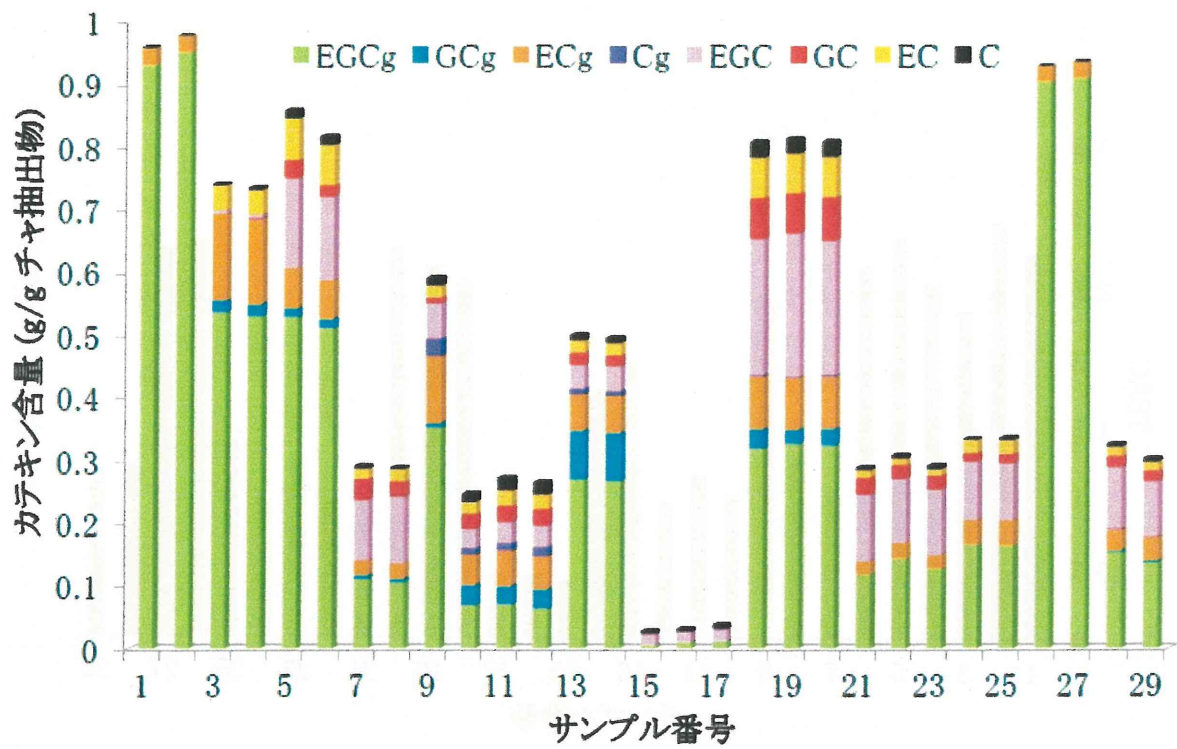


図2 チャ抽出物中のカテキン類含量

表1 カテキン標品の抗酸化力価

	C	EC	GC	EGC	Cg	ECg	GCg	EGCg
IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	65.8	27.3	28.9	22.9	45.7	23.0	25.0	27.1
TEAC	1.00	2.42	2.28	2.84	1.41	2.83	2.64	2.43

表2 チャ抽出物の抗酸化力価 実測値と予測値の関係

カテキン類	相関係数 (n = 29)	回帰式 傾き	カテキン類	相関係数 (n = 29)	回帰式 傾き
C	0.133	0.0012	C, EC, GC, EGC	0.235	0.0769
EC	0.470	0.0296	Cg, ECg, GCg, EGCg	0.907	0.8528
GC	0.167	0.0085	EGC, EGCg	0.925	0.8146
EGC	0.168	0.0376	EGC, ECg, EGCg	0.955	0.8807
Cg	0.007	-0.00007	EC, EGC, ECg, EGCg	0.967	0.9103
ECg	0.553	0.0661	EC, GC, EGC, ECg, EGCg	0.972	0.9188
GCg	0.153	0.0098	EC, GC, EGC, ECg, GCg, EGCg	0.980	0.9286
EGCg	0.855	0.7152	C, EC, GC, EGC, ECg, GCg, EGCg	0.981	0.9298
			全部	0.982	0.9297

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 23 年度分担研究報告書

酸化防止剤力価評価における DPPH 法と ABTS 法における反応特性の検証と

酸化防止剤の併用効果の解析に関する研究

研究分担者 石川 洋哉 福岡女子大学国際文理学部 准教授

研究分担者 松井 利郎 九州大学農学部 教授

研究協力者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

研究要旨

公定法の有力候補である DPPH 法と ABTS 法に関して、両者の活性相関を検討し、反応特性の違いを検証した。21 種の抗酸化物を両法で評価し TEAC 値を比較した結果、活性値が一致するグループ（10 成分）と DPPH 法の活性値が高いグループ（10 成分）に大別されることが明らかになった。DPPH 活性が高い化合物群はいずれもカテコールおよび類似の構造を有していることが明らかになった。さらに、カテコール構造が存在する場合、DPPH 法では約 $1.3(\mu\text{molTE}/\mu\text{mol})$ 分の活性値が上乘せされることが判明した。続いて、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 の適用性を検討した。測定法として DPPH 法を用いて、疎水性酸化防止剤であるトコフェロール類（4 種）を中心とした併用効果を計 51 通りの組合せで検討した。その結果、相乗効果を示す組合せが多数確認されたが、そのほとんどが弱い相乗効果しか示さず、総じてほぼ相加的なものであった。しかしながら、EGCg・ECg などカテキン類との一部の組合せでは比較的強い相乗効果が認められた。一方、レスベラトロールでは唯一相殺効果が確認された。

A. 研究目的

当研究グループでは、厚生労働科学研究費補助金プロジェクトにおいて、抗酸化活性評価法の公定法候補を選定し、その妥当性評価を行ってきた。公定法候補の選定条件は（1）過去の研究において使用されてきた実績があること、（2）短時間での測定が可能であること、（3）特殊な測定機器を必要としない汎用性の高い分光学的測定法であることの 3 項目とした。種々検討し、ラジカル消去活性測定法である DPPH 法と ABTS 法、活性酸素消去活性測定法である WST-1 法を候補として選定した。プロジェクトでは上記 3 法を用いて、既存添加物のうち単一化合物からなる酸化防止剤及び複数成分からなる天然物由来酸化防止剤の測定を行い、得られた結果を比較した。各測定法それ

ぞれに対して、酸化防止剤試薬のロット、試薬秤取量、溶媒容量、溶液調製操作に用いる器具の種類、希釈手順、データ解析方法を実施した結果、いずれの測定法も研究室間での室間再現性が高いことが確認された。しかしながら、WST-1 法は他の 2 法と比較すると再現性が若干劣ること、また疎水性酸化防止剤への適用が困難なことなどの欠点も明確となっている。さらに、DPPH 法に関しては、共同試験等を実施しその妥当性評価が進められている。一方、有力候補とされていた ABTS 法に関しては現在検討が進められておらず、今後 DPPH 法を公定法として検討していく上でも、ABTS 法との違いを明確化しておく必要がある。そこで本研究では、抗酸化活性評価法の公定法候

補である DPPH 法と ABTS 法における反応特性の違いを詳細に検討した

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うえで、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。我々は、併用効果の有効な解析法を模索し、薬剤の併用効果解析法として用いられてきた『Median effect analysis』¹⁾を抗酸化食品成分併用効果の新規解析法として新たに提案した。平成 20-23 年度の研究では、「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中で単一の成分からなる添加物を数種用い、DPPH 法及び WST-1 法により活性測定を行い、その結果を Median effect analysis により解析した。さらに、Median effect analysis による反応型の検証により、酸化防止剤両者が排他的（拮抗的）に反応していることを明らかにし、併用効果の解析に使用実績のある Fractional product method が適用困難であることを示した。さらに Median effect analysis では濃度レベルに応じた判定も可能であることを示し、本法の有用性を明らかにしてきた。

これまで様々な抗酸化物の組合せで併用効果の解析を試みてきたが、一部で解析結果が測定毎に異なることが問題となっていた。種々検討した結果、その原因が Median effect 解析時の Median effect plot の直線性の低下（バラツキ）にあると推察した。すなわち、反応溶液中で抗酸化物が高濃度になると、ラジカル阻害効果が頭打ちになり、Median effect plot の相関係数が低下し、相乗・相殺効果判定のカギとなる Median effect plot の傾きの値 (m) が測定毎に異なる結果となっていた。そこで、本年度抗酸化物の濃度範囲を設定し（阻害効果が 70-80% 程度までの濃度範囲）、種々の組合せで併用効果を検討した。具体的には、4 種のトコ

フェロール（ α -、 β -、 γ -、 δ -）を中心とした併用効果を網羅的に検討した。

B. 研究方法

(1) 対象化合物

抗酸化物（酸化防止剤）として、カテキン水和物、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECg)、エピガロカテキンガレート (EGCg)、ケルセチン水和物、ケンフェロール、ケルセチン-3-グルコシド、ルチン、ミリセチン、モリン水和物、ルテオリン、フェルラ酸、ピロカテコール、カフェ酸、没食子酸水和物、セサモール、エラグ酸、アスコルビン酸、グルタチオン（還元型）、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、 δ -トコフェロールを用いた。

(2) DPPH ラジカル消去活性測定法

試験管に試料溶液 200 μ L、100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 800 μ L、0.20 mM DPPH エタノール溶液 1 mL を添加し、10 秒間激しく攪拌した後、暗所で常温にて 30 分間静置した。30 分後、反応溶液の 517 nm における吸光度 (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場合の吸光度をコントロール (Ac) とした。また、DPPH 溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を求めた（下式）。

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

各試料と標準物質であるトロロックスの IC₅₀ (μ mol/mL) をそれぞれ求め、下式によりトロロックス等価活性 TEAC (μ mol TE/ μ mol) を算出した。

$$\text{TEAC} = \frac{\text{トロロックスの IC}_{50} (\mu\text{mol/mL})}{\text{試料の IC}_{50} (\mu\text{mol/mL})}$$

(3) ABTS ラジカル消去活性測定法

試験管に ABTS working solution 1 mL を加え、100 μ L の試料溶液を添加後、10 秒間攪拌した。この溶液を 30°C でインキュベーションし、試料溶液の添加から正確に 4 分後に 734 nm における吸光度 (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場合の吸光度をコントロール (Ac) とした。また、ABTS 溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を求めた (上式; DPPH 法と同様)。DPPH の場合と同様に、各試料と標準物質であるトロロックスの IC₅₀ (μ mol/mL) をそれぞれ求め、トロロックス等価活性 TEAC (μ mol TE/ μ mol) を算出した。

(4) 併用効果の判定

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 年度の厚生科学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 DPPH 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 IC₅₀ 濃度の比 (モル比) に近い割合で混合して、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) を用いた。

C. 研究結果及び考察

まず、21 種類の抗酸化物質を DPPH 法と ABTS 法を測定し、両者の活性相関を検討し、図 1 に示した。図に示したように、化合物全体で見ると、DPPH 法での活性値と ABTS 法の活性値の相関は高くない結果となった ($r = 0.764$)。しかしながら、表 1 に示したように、両者の活性値を比較す

ると以下の 3 グループに大別できることが明らかになった。すなわち、供試した抗酸化物質は DPPH > ABTS (太字)、DPPH \approx ABTS、DPPH < ABTS (下線、セサモールのみ) の 3 グループに分けられることが判明した。特に興味深いのは、DPPH > ABTS (太字) の抗酸化物質は、いずれも分子内にカテコールあるいは類似の構造を有していることであった。一方、カテコール構造を有さない化合物群はセサモールの場合を除き、DPPH \approx ABTS となった。フラボノイド化合物の B 環のカテコール構造及びピロガロール構造は、抗酸化活性において重要な活性発見因子の一つであることが知られているが、本実験の結果より、DPPH 法では、DPPH ラジカルのカテコール構造に対する感度 (反応性) が特異的に高いことが判明した。続いて、抗酸化物質のカテコールの有無を考慮して、カテコール構造有り群 (DPPH \approx ABTS) とカテコール構造無し群 (DPPH > ABTS) に分けて、再度 DPPH 法と ABTS 法の活性値の相関性を検討した (図 2)。その結果、カテコール無し群では、傾きが 0.957 でほぼ原点を通る直線が得られた ($r = 0.998$)。一方、カテコール有り群では直線がほぼ平行移動した形となった (傾き 0.901, $r = 0.957$)。この移動量は TEAC 値でおよそ 1.3 (μ mol TE/ μ mol) であった。この結果は抗酸化物質にカテコール構造が存在する場合、DPPH 法では ABTS 法と比較して約 1.3 (μ mol TE/ μ mol) 程度の活性値が上乘せされることを示唆している。

我々が作成したプロトコルにおいて、DPPH 法と ABTS 法では反応時間が異なっている。反応時間は、各抗酸化物とラジカルとの反応が平衡状態になる時間を考慮して設定したものであるが、ABTS 法では総じて反応が速やかに進行することから 4 分間という反応時間を設定している。一方、DPPH 法では化合物により反応速度が異なり、緩やかに反応する化合物も存在することから 30 分間に設定している。上述のように DPPH 法と ABTS 法で活性値が異なり、カテコール構造を有する化合物群において DPPH > ABTS の傾向が認められた原因が単に反応時間に起因する可能性も考えら