法によって純度評価を行ったglycyrrhizic acid標準品を用いるHPLC法による定量が望ましいものと思われる。

引用文献

1) 田原麻衣子、杉本直樹、末松孝子、有福和紀、斉藤　剛、井原俊英、吉田雄一、多田敦子、久保田領志、清水久美子、山崎　壮、棚元憲一、中澤裕之、西村哲治：qNMRに基づく有機リン系農薬イソキサンチンオキソンの品質管理、*日本食品化学会雑誌* **16**, 28-33 (2010).
2) 第16改正日本薬局方、日本公定書協会、東京、p. 1474-1475、2011.

E. 研究発表

(1) 学会発表

なし

(2) 論文発表

Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F., Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T., Mizukami, H.: Quantitative determination of carthamin in Carthamus Red by ^{1}H-NMR spectroscopy, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **61**, 1264-1268 (2013).

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1　市販のglycyrrhizic acid試薬のqHNMR法による純度評価

No.	Compound	Supplier	Claimed purity (%)	Claimed water content (%)	qNMR purity (n=3) (%)
1	Glycyrrhizic acid standard	A		<7	87.7±0.6
2	Glycyrrhizic acid standard	B	99	<5.8	88.2±1.3
3	Glycyrrhizin	B	90		88.9±0.6
4	Glycyrrhizic acid monoammonium salt	B	90		70.0±0.7
5	Glycyrrhizic acid dipotassium salt	B	96-102		80.0±1.1
6	Glycyrrhizic acid ammonium salt	C	95		69.4±0.8
7	Glycyrrhizic acid ammonium salt	C	70	<7	72.3±0.6
8	Glycyrrhizic acid	D	ca. 70%		71.0±0.6
9	Glycyrrhizic acid potassium salt	D	ca. 70%		66.7±1.3
10	Glycyrrhizic acid ammonium salt	D	ca. 70%		62.3±1.0

表2 qHMR法によるカンゾウ抽出物中のglycyrrhizic acidの定量

No.	製品名	製造者	含量(%)	
			qNMR	HPLC
A27	カンゾウ抽出物	A	57.2 (H12)	48.0
A29	カンゾウ抽出物	B	7.6 (H9)	4.81
A326	カンゾウ抽出物	A	4.6 (H9)	3.90

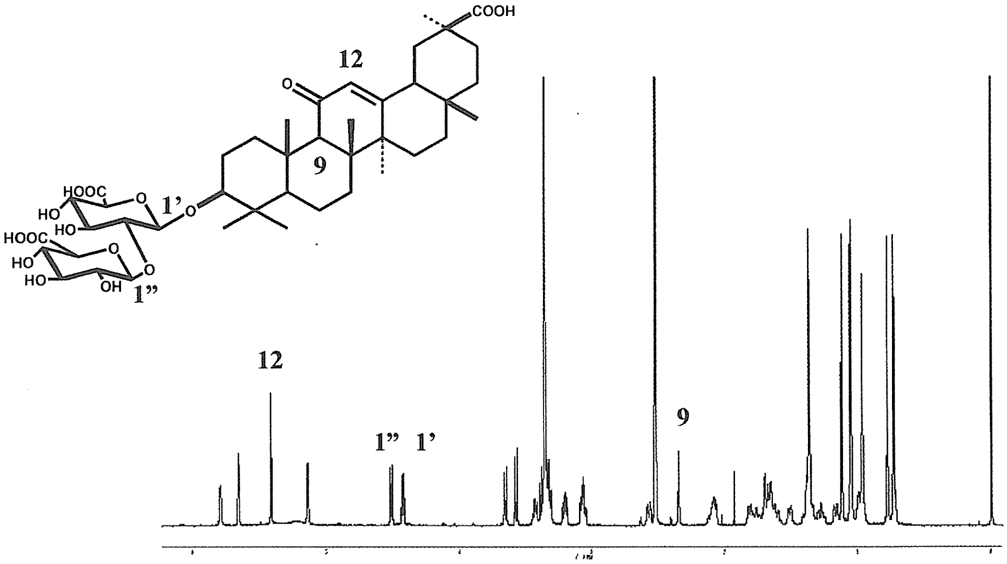


図1 Glycyrrhizic acid の構造と^{1}H-NMRスペクトル（DMSO-*d6*, 600 MHz）

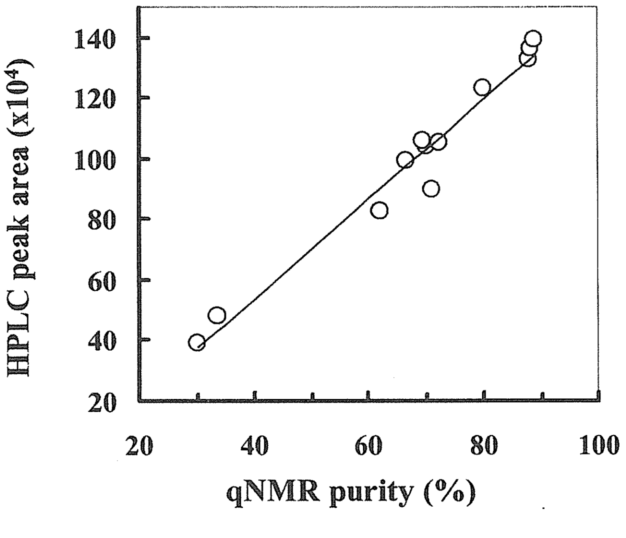


図2 市販glycyrrhizic acid試薬のqHNMR法を用いて測定した純度とHPLCクロマトグラム中のglycyrrhizic acidピークの面積の相関性

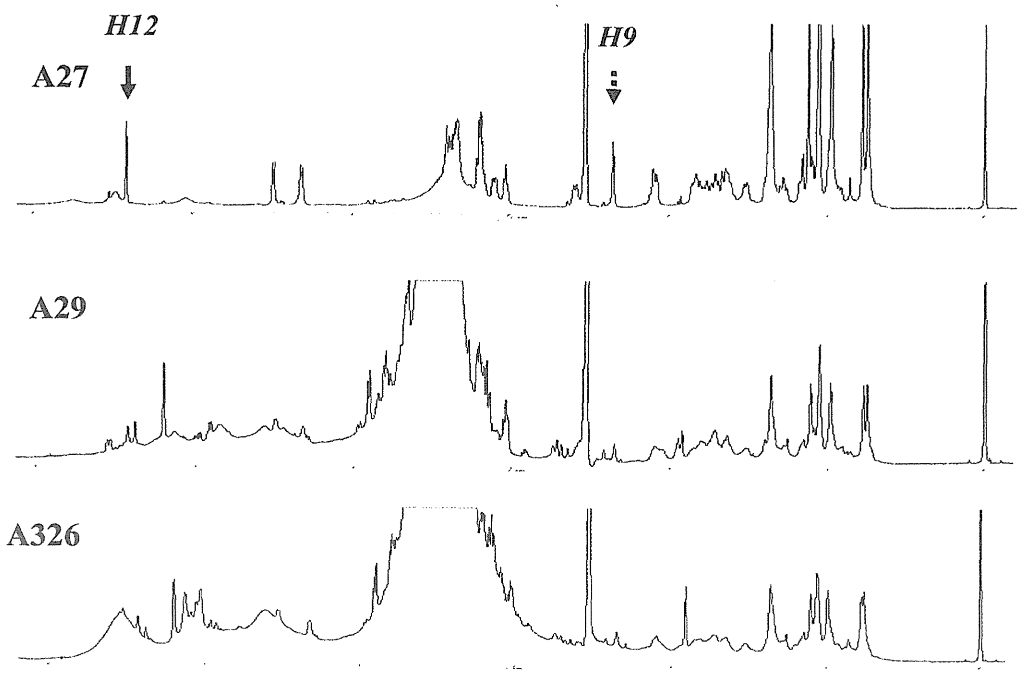


図3　カンゾウ抽出物の^{1}H-NMRスペクトル（DMSO-*d6*, 600 MHz）

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 25 年度分担研究報告書

酸化防止剤力価評価における DPPH 法の複数機関による評価 - データの再解析 -

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　教授

研究協力者　石川 洋哉　福岡女子大学国際文理学部　准教授

研究協力者　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 丈拡　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標準法としての DPPH 法の適用性を検討するために、4 種類の既存添加物と Trolox を分析試料として用い、14 か所の試験機関による評価研究を行った。以前の報告では、主に各試験機関が報告した吸光度に着目した解析を行ったが、抗酸化力価の室内再現精度、および室間再現精度をより正確に検証することを目的とし、IC_{50} 値、ならびに Trolox 等価活性 (TEAC) を用いて再解析を行った。その結果、DDPH 法の改良プロトコルを用いた複数機関による評価研究では、同一試験機関内での再現性が極めて高いことが判明した。また、室間再現精度も既報と比較して高いものであった。これにより、本 DPPH は既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価の標準法として、適用可能であると判断した。

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、有効成分含量や成分組成を指標とした規格基準の設定が必要である。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。しかし、既存添加物に分類される酸化防止剤中に存在する全ての抗酸化物質の同定を行うことが困難である場合もある。従って、成分組成に基づく規格が未だ設定できていない既存添加物の抗酸化力価に関しては、一定の品質確保のため有効成分の分析を必要としない標準法の確立が必要と考えられる。

このような背景のもと、これまでに代表的なラジカル消去活性測定法の一つである 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法を標準法の候補として選出し、予備的な小規模共同試験（試験機関: 3 か所）を実施した [1]。その後、小規模共同試験結果を参考に DPPH 法のプロトコルの改良を行い、既存添加物に分類される酸化防止剤 4 種類（チャ抽出物、ブドウ種子抽出物、エンジュ抽出物、*d*-α-トコフェロール）と 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) の計 5 個の分析試料の抗酸化力価を 14 か所の複数試験機関にて評価した。先の報告 [2] では主に各試験機関が報告した吸光度に着目した解析を行ったが、本研究では結果として得られた抗酸化力価の

室内再現性、および室間再現性をより正確に検証するため、Trolox 等価活性 (TEAC)、ならびに IC_{50} 値を用いて再解析を行った。

B. 研究方法

(1) 参加機関

本試験には以下の 14 機関が参加した： 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。以下、これらの試験機関を順不同で A～N と表記する。

参加機関には試薬、ならびに分析試料の調製方法、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た。

(2) 分析試料

分析試料として、日本添加物協会より提供された食品添加物製品 (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：プロアントシアニジン)、エンジュ抽出物 (主成分；ルチン)、*d*-α－トコフェロール、ならびに Trolox (Sigma-Aldrich 製) を使用した。上記分析試料は同一ロットのものを各機関に配布した。分析試料の保管方法、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

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 (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、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、1.00 ± 0.05 の範囲内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 秒間撹拌した。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 As、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 Ac とし、次の計算式から阻害率 (%) を求めた。

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

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 回の繰り返し測定の各回で求められた③の値の平均値を求めた。これを試料の IC_{50} (μg/mL) とした。

3-4. Trolox 等価活性算出方法

試料のIC_{50}が Trolox の IC_{50}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) で示した。算出には以下の式を用いた。

TEAC =

Trolox の IC_{50} (μg/mL)/試料の IC_{50} (μg/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、本試験では、酸化防止剤試料の IC_{50}と Trolox 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、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)、RSD 比 (RSD_R/RSD_r) を算出した。データの解析には Microsoft Office Excel 2010 を使用した。

C. 研究結果

(1) 各試験機関の報告値

各試験機関が報告した酸化防止剤の IC_{50} (μg/mL) を Table 1、Trolox の IC_{50} (μg/mL) を Table 2 に示した。なお、本試験では酸化防止剤 1 種と Trolox の測定を同日中に行い、同日中に得られた Trolox の IC_{50}を基に各酸化防止剤の TEAC を算出した。従って、Table 2 に示したように、同一日に測定した Trolox を独立した 1 系列として扱い解析を行った。Table 3 には Table 1 と 2 の値から算出した TEAC の値を示した。

(2) 複数機関における評価結果

既存添加物に分類される酸化防止剤、ならびに Trolox の IC_{50}に関する共同試験結果を Table 4 と Table 5 に示した。また、TEAC に関する共同試験結果を Table 6 に示した。

2-1. 酸化防止剤の IC_{50}

チャ抽出物、ブドウ種子抽出物、エンジュ抽出物、*d*-α－トコフェロールの IC_{50}に関する検証では (Table 4)、エンジュ抽出物の結果のうち、試験機関 L が外れ値と判断された。これは試験機関 L の IC_{50}の平均値が他と比較して大きいことが原因であった (Table 1)。4 つの酸化防止剤に関する室内再現相対標準偏差 (RSD_r) は 2.2-2.9%、室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 3.1-11%となった。

2-2. Trolox の IC_{50}

Trolox の場合 (Table 5)、エンジュ抽出物と同日に測定を行った Trolox について試験機関 L と M が外れ値と判断された。試験機関 L の場合、平均値が他と比較して大きいことが原因であった。試験機関 M の場合は、他と比較して 3 回の繰り返し測定の結果の分散が大きいと判断されたことが原

因であった。Trolox の IC_{50} に関する室内再現相対標準偏差 (RSD_r) は 1.8-2.2%となり、室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 4.0-7.9%であった。

2-3. TEAC

TEAC については (Table 6)、チャ抽出物において試験機関 F と J が外れ値と判断された。試験機関 F の場合、TEAC の平均値が他と比較して低い値となったことが原因であった。これは、チャ抽出物の IC_{50} が平均的な値であったのに対して、同日に測定を行った Trolox の IC_{50} が参加試験機関の中で最も大きい値であったことに起因していた。また、試験機関 J の場合は、他と比較して 3 回の繰り返し測定の結果の分散が大きいと判断されたことが原因であった。これは、チャ抽出物の IC_{50} の分散が比較的大きかったことに起因していた。一方で、エンジュ抽出物の IC_{50}、ならびに同日に測定を行った Trolox の IC_{50} の両方において外れ値と判断された試験機関 L は、TEAC の検証では外れ値とはならなかった。これは、Trolox と試料の IC_{50} 共に他機関と比較して大きい値を示す傾向にあったことから、TEAC に変換された時に補正された値となったものと考えられた。TEAC に関する室内再現相対標準偏差 (RSD_r) は 2.1-2.5%、室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 3.7-9.3%となった。

D. 考察

室内再現相対標準偏差 (RSD_r) の値は IC_{50} と TEAC 共に 3.0%以下であったことから、本 DPPH 法による分析は同一試験機関内の再現性が極めて高いことが判明した。また、一般的に化学分析法の RSD 比は 1.5-2 の範囲であるとされている[3)]。今回の IC_{50} に関する結果では (Table 1, 2)、大部分で RSD 比の値が 2 以上であったものの、TEAC (Table 3) ではチャ抽出物、エンジュ抽出物、*d*-α－トコフェロールで RSD 比が 2 以下となり、IC_{50} と比較して改善傾向が認められた。このことから、同一日に測定した酸化防止剤の IC_{50} と Trolox の IC_{50} を対応させた値である TEAC を用いることが、試験機関の間の値のばらつきを低くして変動を補正することに有効であると考えられた。

過去に、様々な食品成分に関する規格試験法の妥当性評価研究が行われているが、抗酸化活性測定法に関する大規模な評価研究は報告例が少ない。例えば、14 か所の試験機関が参加し、(+)-カテキン、フェルラ酸、カフェイン酸、ヘスペレチン, Trolox, および 5 種類の食品 (キャベツ, タマネギ, リンゴ, 温州ミカン, ナス) を試験試料とした改良 Hydrophilic Oxygen Radical Absorbance Capacity (H-ORAC) 法の室間共同試験[4)] の場合, その H-ORAC 値 (μmol Trolox/L) の室内再現相対標準偏差 (RSD_r) は 4.6-19%, 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 7.0-21%と報告されている。また、更なる改良を行った H-ORAC 法について同様の試料を用い、5 つの試験機関で評価を行った結果は、室内再現相対標準偏差 (RSD_r) が 1.8-9.4%、室間再現相対標準偏差 (RSD_R) が 4.4-14%になったと報告されている。その他、食品や飲料の抗酸化活性評価法としての DPPH 法に関する室間共同試験も報告されている[5)]。既報[5)] で用いられた DPPH 法は DPPH 濃度、反応溶液の全量、反応時間、反応温度が本法とは大きく異なるものであったが、9 か所の試験機関が参加し、11 の食品、ならびに飲料を DPPH 法で評価しており、その場合の抗酸化活性 (μmol Trolox/100 g) の室内再現相対標準偏差 (RSD_r) は 1.1-25%、室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 5.3-59%であったとの報告されている。測定原理や反応条件が異なることから、
上記の報告との直接的な比較は難しいが、本研究の室内再現性と室間再現性は，過去の報告と比較して精度に関しては高いと考えられた。

また，本試験は各試験機関がもとより所有していた分光光度計を用いて吸光度測定を行った。従って、機種等の統一は行われていないが、分光光度計の機種や吸光度測定方法の違いは抗酸化力価評価の測定結果に大きな影響を及ぼさなかった。すなわち、本 DPPH 法は吸光度計の機器の種類に影響を受けない頑健性を有していると考えられた。

以上のことから、本報告で用いた DPPH 法のプロトコルは既存添加物に分類される酸化防止剤の力

価評価の標準法として適用可能であると判断した。今後は、他の既存添加物の抗酸化力価に関するデータを蓄積することを継続し、個々の酸化防止剤について抗酸化力価に基づく具体的な規格基準値の設定を目指す。

E.　結論

本研究では、既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価標準法としてのDPPH法の適用性を検討するために、4種類の既存添加物とTroloxを分析試料として用いて14か所の試験機関による評価研究を行った。その結果、今回用いたDPPH法による分析結果は、同一試験機関内での再現性が極めて高いことが判明した。また、室間再現精度も既報と比較して高いものであった。これにより、本DPPHは既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価の標準法として適用可能であると判断した。今後は、個々の酸化防止剤について抗酸化力価に基づく具体的な規格基準値の設定を目指す予定である。

参考文献

1) 島村他、食科工、54、482-487 (2007).
2) 受田他、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、11-22 (2011).
3) Horwitz, *et al.*, *J. AOAC.*, 63, 1344-1354 (1980).
4) Watanabe, *et al.*, *Anal. Sci.*, 28, 159-165 (2012).
5) Plank, *et al.*, *J. AOAC Int.*, 95, 1562-1569 (2012).

F.　研究発表

1.　論文発表 なし
2.　学会発表 なし

Table 1 IC_{50} values of natural food additives determined by DPPH assay in the inter-laboratory study (n = 3)

Laboratory	IC_{50} (μg/mL)			
	Tea extract	Grape seed extract	Enju extract	*d*-α-Tocopherol
A	27.0	38.0	76.6	141
B	25.2	33.7	75.6	139
C	25.7	33.5	73.9	133
D	29.4	32.7	77.6	137
E	24.2	31.1	77.8	134
F	30.8	36.1	77.8	142
G	25.3	33.4	74.1	129
H	24.4	33.5	74.9	134
I	26.2	32.9	78.2	143
J	20.7	31.4	74.6	148
K	25.3	37.5	76.4	150
L	27.5	35.9	92.1	137
M	25.7	34.4	75.3	130
N	26.3	31.5	74.9	135

Table 2 IC_{50} values of Trolox determined by DPPH assay in the inter-laboratory study (n = 3)

Laboratory	IC_{50} (μg/mL)			
	Trolox			
	Tea extract	Grape seed extract	Enju extract	*d*-α-Tocopherol
A	64.2	64.3	64.6	61.3
B	57.9	61.9	61.4	63.0
C	62.9	60.8	59.8	58.5
D	65.9	61.8	63.5	62.7
E	56.7	57.6	61.5	61.8
F	61.2	65.2	62.7	65.1
G	59.1	59.1	59.3	58.5
H	56.4	58.1	58.5	60.5
I	62.9	61.2	63.1	61.9
J	55.9	55.5	61.2	64.4
K	61.5	50.6	61.0	63.0
L	64.1	62.9	70.1	61.5
M	58.7	61.4	57.6	58.3
N	59.1	58.0	59.3	61.9

Table 3 TEAC of natural food additives determined by DPPH assay in the inter-laboratory study (n = 3)

Laboratory	TEAC			
	Tea extract	Grape seed extract	Enju extract	*d*-α-Tocopherol
A	2.38	1.69	0.84	0.44
B	2.30	1.84	0.81	0.45
C	2.45	1.82	0.81	0.44
D	2.24	1.89	0.82	0.46
E	2.34	1.85	0.79	0.46
F	1.99	1.81	0.81	0.46
G	2.34	1.77	0.80	0.46
H	2.32	1.73	0.78	0.45
I	2.40	1.86	0.81	0.43
J	2.71	1.77	0.82	0.44
K	2.44	1.35	0.80	0.42
L	2.33	1.76	0.76	0.45
M	2.29	1.79	0.77	0.45
N	2.25	1.85	0.80	0.46

Table 4 Inter-laboratory study results for determination IC_{50} values of natural food additives

	Tea extract	Grape seed extract	Enju extract	*d*-a-Tocopherol
Number of laboratories [a)]	14 (0)	14 (0)	13 (1)	14 (0)
Grand mean (mg/mL)	26.0	34.0	75.9	138
Repeatability standard deviation (S_r)	0.76	0.88	2.02	3.05
Repeatability limit (r)	2.13	2.46	5.67	8.54
Repeatability relative standard deviation (RSD_r)	2.9	2.6	2.7	2.2
Reproducibility standard deviation (S_R)	2.96	2.76	2.38	8.27
Reproducibility limit (R)	8.30	7.71	6.66	23.2
Reproducibility relative standard deviation (RSD_R)	11	8.1	3.1	6.0
RSD_R /RSD_r	3.9	3.1	1.2	2.7

[a)] Reatined after outlier laboratories removed, and number of outlier laboratories in parentheses.

Table 5 Inter-laboratory study results for determination IC_{50} values of Trolox

	Trolox			
	Tea extract	Grape seed extract	Enju extract	*d*-a-Tocopherol
Number of laboratories [a)]	14 (0)	14 (0)	12 (2)	14 (0)
Grand mean (mg/mL)	60.5	59.9	61.3	62
Repeatability standard deviation (S_r)	1.34	1.30	1.11	1.21
Repeatability limit (r)	3.75	3.65	3.10	3.40
Repeatability relative standard deviation (RSD_r)	2.2	2.2	1.8	2.0
Reproducibility standard deviation (S_R)	4.05	4.74	2.43	2.70
Reproducibility limit (R)	11.35	13.28	6.82	7.6
Reproducibility relative standard deviation (RSD_R)	6.7	7.9	4.0	4.4
RSD_R /RSD_r	3.0	3.6	2.2	2.2

[a)] Reatined after outlier laboratories removed, and number of outlier laboratories in parentheses.

Table 6 Inter-laboratory study results for determination TEAC of natural food additives

	Tea extract	Grape seed extract	Enju extract	*d*-a-Tocopherol
Number of laboratories [a)]	12 (2)	14 (0)	14 (0)	14 (0)
Grand mean (mg/mL)	2.34	1.77	0.80	0.45
Repeatability standard deviation (S_r)	0.05	0.04	0.02	0.01
Repeatability limit (r)	0.14	0.12	0.06	0.03
Repeatability relative standard deviation (RSD_r)	2.1	2.5	2.5	2.3
Reproducibility standard deviation (S_R)	0.09	0.17	0.03	0.02
Reproducibility limit (R)	0.25	0.46	0.09	0.05
Reproducibility relative standard deviation (RSD_R)	3.8	9.3	3.8	3.7
RSD_R /RSD_r	1.8	3.8	1.5	1.6

[a)] Reatined after outlier laboratories removed, and number of outlier laboratories in parentheses.

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）
既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究
平成25年度分担研究報告書

酸化防止剤の併用効果の解析に関する研究

研究分担者　松井　利郎　九州大学農学部　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　受田　浩之　高知大学農学部　教授

研究要旨

Median effect analysis を用いて、各種酸化防止剤の併用効果の解析を試みた。本年度は、特にチオール化合物（グルタチオン、システイン）と各種抗酸化物（15種）の併用効果の解析を行った。その結果、グルタチオン・システインいずれとの併用時も、フェルラ酸、ケンフェロール以外の13種の抗酸化物との組合せで高い相乗効果が確認された。また、供試した濃度範囲によって効果が異なり、より高濃度域においてCI値が小さくなる傾向､すなわち高濃度域で大きな相乗効果を発現することが確認された。相乗効果を示した化合物群は，いずれも分子内にカテコールあるいはピロガロール構造を有していることが明らかになった。相乗効果の程度は、グルタチオンとの併用ではカテコール化合物＞ピロガロール化合物であり、システインではカテコール化合物とピロガロール化合物の効果に明確な順列はつかなかった。また、グルタチオンでは、CI値＜0.5（小さいほど相乗）の強い相乗性を示す組合せが8通りにのぼったのに対して、システインでは2通り（ECG, EGCg）のみで、総じてグルタチオンとの相乗効果が高い結果となり、チオール類の種類により効果が異なることが示された。

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、薬剤の併用効果解析法である『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添加物を数種用い、DPPH法あるいはABTS法（24年度）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。

これまで本研究では、特にトコフェロール類を中心として、フラボノール類・カテキン類などとの併用効果を解析し、その結果を比較検討してきた。トコフェロール類としては、酸化防止剤として最も重要なα-トコフェロールだけでなく、β-, γ-, δ-トコフェロール3種も加え、計51通りの組合せで併用効果を網羅的に検討している。その中で、相乗効果を示す組合せは多数確認されているが、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が、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ている。相乗効果の発現メカ

ニズムについては不明な点も多いが、我々は抗酸化物の再生作用に起因すると推察している。すなわち、抗酸化反応後に生成する抗酸化物ラジカルを他方の抗酸化物が再生することによる協調的効果が相乗効果に重要な役割を果たしていると考えている。一方、チオール化合物が抗酸化物のカテコール構造を再生し、相乗効果を発現することが報告されている。しかしながら、どの様な組合せで、どの程度の相乗効果が発現するのかを詳細に検討した報告例は見当たらない。

そこで、本研究では代表的なチオール化合物であるグルタチオン・システインを用い、カテキン類・フラボノール・フェノールカルボン酸類など15種の抗酸化物との併用効果を網羅的に解析した。

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、フェルラ酸、カフェ酸、プロトカテク酸、没食子酸水和物、グルタチオン(還元型)、システインを用いた。

(2) DPPHラジカル消去活性測定法

試験管に試料溶液 200 μL、100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 800 μL、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 (μmoL/mL)をそれぞれ求め、下式によりトロロックス等価活性 TEAC (μmoL TE/μmoL)を算出した。

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

(3) 併用効果の解析法

本法は、以下の式(Median effect equation)に基づく解析方法である。

$fa/fu = (D/Dm)^m$

ここで、fa は阻害割合、fu は非阻害割合, D は dose(濃度)、Dm は Median effect(本実験では IC_{50})を生じる濃度、m は Hill 型の係数を示す。式を変形すると以下のようになり、

$\log(fa/fu) = m \log(D/Dm)$

log (D/Dm)(あるいは log D)を横軸に、log(fa/fu)を縦軸にプロット(Median effect plot)することにより、傾き m を求めることが出来る。酸化防止剤単独及び併用時の Median effect plot から得られる m 値を基に、CI(Combination Index)値を算出し併用効果を判定する(CI< 1 相乗効果, CI= 1 相加効果, CI> 1 相殺効果)。

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 IC_{50} 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、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(Hulinks 社 CalcuSyn ver. 2.0)を用いた。

C. 研究結果及び考察

まず、グルタチオンと 15 種の抗酸化物の併用効果を解析した。解析結果の一例として、グルタチオンとケルセチン、グルタチオンとミリセチンの結果を図 1、2 にそれぞれ示した。DPPH 法で得られた阻害割合を濃度に対してプロットした結果が、それぞれの上図（Median effect plot）であり、得られた 3 本の直線の傾きの値を用いて併用効果を解析した CI プロットが下図に相当する。なお、CI プロットでは、横軸に Fa 値すなわち阻害割合をとるが、この値は添加濃度と連動した値となるため、Fa 値が高い方ほど添加濃度が高いことを意味する。図に示したように、両者の CI プロットでは CI 値はいずれも 1＜となっており、相乗効果を示している。また、Fa 値が増加するに従い、CI 値が低下しており、このことは添加濃度の増加に伴い相乗効果が大きくなることを示唆している。ケルセチンの CI 値は、ミリセチンよりも全般的に小さいことから、グルタチオンとケルセチンの相乗効果が大きいことが明らかとなっている。同様のやり方で、15 通りの組合せの併用効果をまとめた結果が、表 1 となっている。なお、表には便宜上 Fa=0.8（80％阻害）の場合の CI 値を示しており、表の昇順は相乗効果の程度に基づいている。表に示したように、フェルラ酸、ケンフェロール以外の 13 化合物は全て、相乗効果を示した。特に、上から 8 番目（Q-3-G; ケルセチン-3-グルコシド）までの化合物は CI<0.5 となっており相乗効果が極めて高いことが判明した。また興味深いことに、それら 8 化合物すべてが分子内にカテコール構造を有していることも確認された。相乗効果を示したその他化合物（モリン以外）は分子内にピロガロール構造を有していた。以上の結果、カテコール・ピロガロール構造がいずれも相乗効果の発現に重要な因子となっており、相乗効果の程度はカテコール類＞ピロガロール類となることが示された。上述の通り、抗酸化物間での相乗効果には、抗酸化物の再生効果が大きく関わっていると推測される。今回の実験結果は、それを強く支持するものであった。すなわち、抗酸化物の再生の程度については、本年度の福岡女子大学分担研究報告書に示してあるが、カテコール＞ピロガロールの順に再生反応が起こりやすいことが明らかになっており、この抗酸化物の再生されやすさが、相乗効果に大きく影響を及ぼしている可能性が示唆された。続いて、システインとの併用効果を同様に検討した（表 2）。グルタチオンの場合と同様にフェルラ酸、ケンフェロール以外の 13 化合物は全て、相乗効果を示したが、相乗効果の程度は全体的に僅かに小さい結果となった。CI<0.5 の強い相乗効果を発現したのは、ECg, EGCg の 2 種のカテキン類のみであった。また、カテコール・ピロガロール構造がいずれも相乗効果の発現に重要な因子と考えられるが、グルタチオンの場合のように、構造ごとのはっきりとした順列はつかなかった。以上の結果は、チオール化合物の種類（アミノ酸とペプチドの違い）によっても併用効果が大きく異なることを示唆するものであった。

D. 結論

本年度の研究では、チオール化合物と各種抗酸化物との併用効果を、Median effect analysis を用いて解析した。チオール化合物との併用時にカテコール・ピロガロール構造を有する抗酸化物が大きな相乗効果を発現することが明らかになった。本研究で、抗酸化物の効果的な活用に重要な知見と考えられた。

E. 研究発表

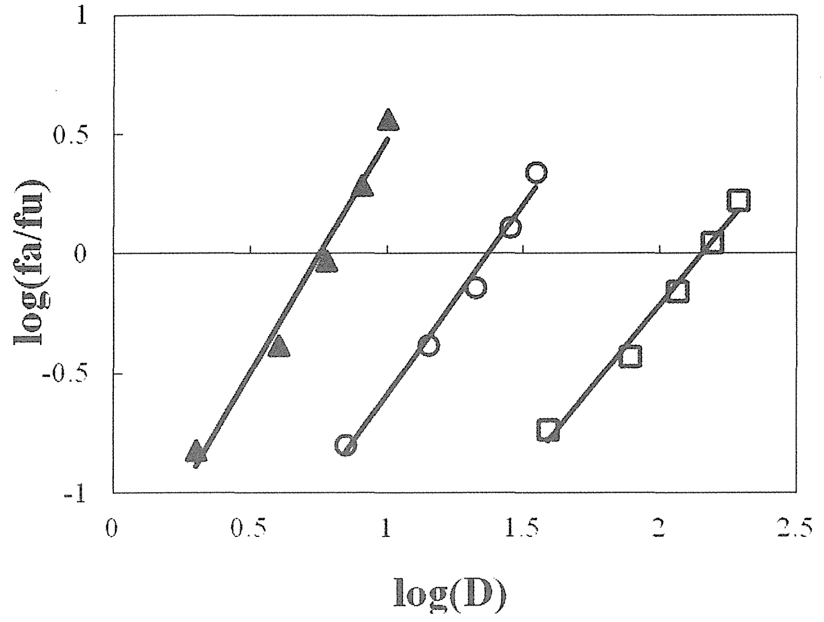
1. 論文発表

なし

2. 学会発表

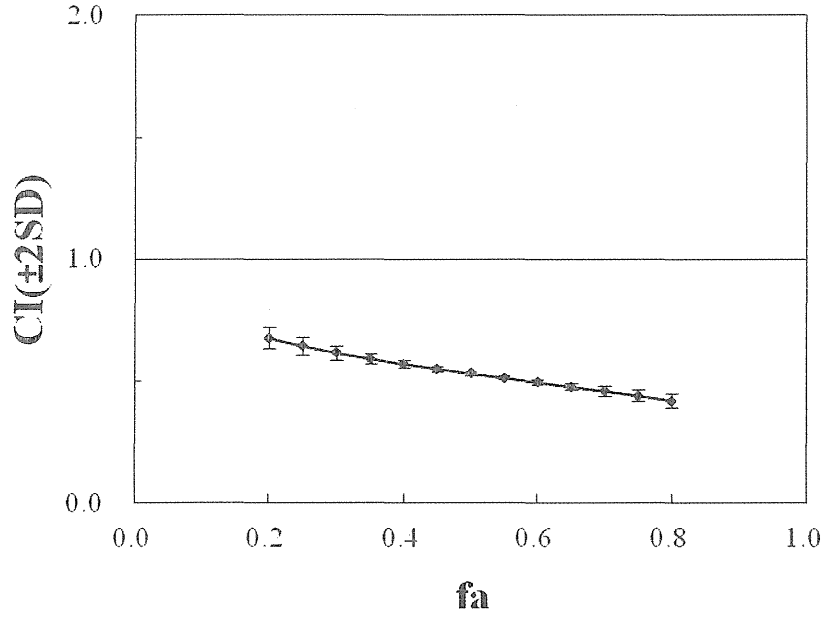
山元 涼子、 藤田 睦、山内 良子、島村 智子、柏木 丈拡、 受田 浩之、穐山 浩、松井 利郎、石川 洋哉　Median effect analysis によるチオール化合物と各種抗酸化物の相互作用解析　第 50 回化学関連支部合同大会 (2013.7)

図１　グルタチオンとケルセチンの併用効果解析



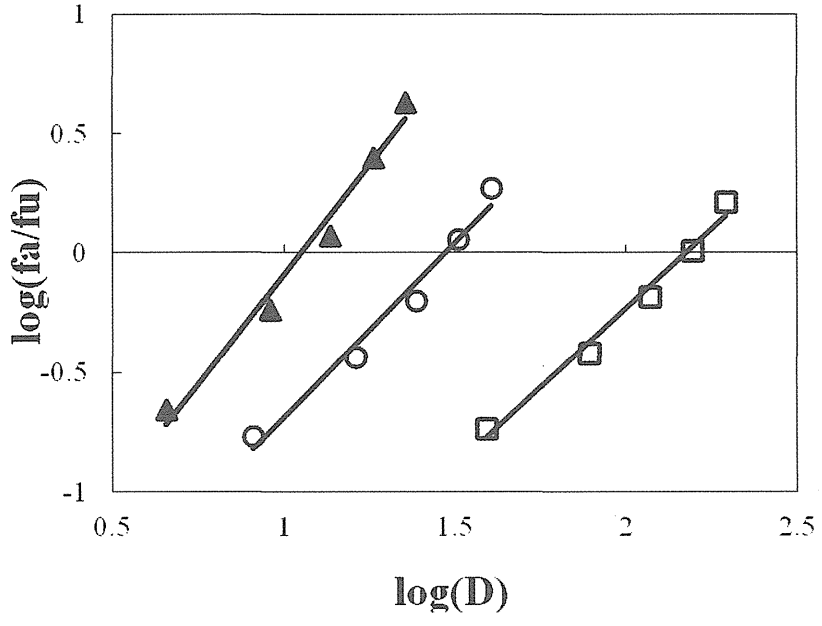
(a)Median effect plot

○：ケルセチン (m=1.59)
□：グルタチオン(m=1.37)
▲：併用(m=1.96)



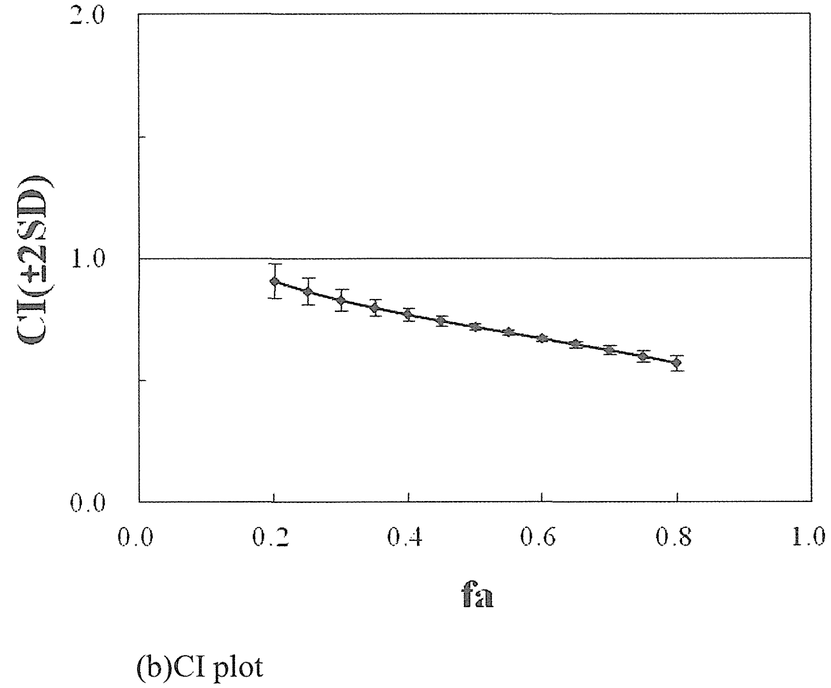
(b)CI plot

図２　グルタチオンとミリセチンの併用効果解析



(a)Median effect plot

○：ミリセチン (m=1.46)
□：グルタチオン(m=1.32)
▲：併用(m=1.82)



(b)CI plot

表１　グルタチオンとの併用効果のまとめ

	CI値	
カテキン	0.29 ± 0.01	相乗
カフェ酸	0.35 ± 0.02	相乗
プロトカテク酸	0.35 ± 0.01	相乗
EC	0.36 ± 0.00	相乗
ECg	0.37 ± 0.02	相乗
ルチン	0.39 ± 0.01	相乗
ケルセチン	0.42 ± 0.03	相乗
Q-3-G	0.50 ± 0.01	相乗
EGCg	0.56 ± 0.01	相乗
ミリセチン	0.57 ± 0.03	相乗
モリン	0.68 ± 0.07	相乗
EGC	0.75 ± 0.01	相乗
没食子酸	0.75 ± 0.01	相乗
フェルラ酸	0.95 ± 0.09	相加
ケンフェロール	1.10 ± 0.02	相加

相乗効果大 ↑

表２　システインとの併用効果のまとめ

	CI値(Fa=0.8)	
ECg	0.46 ± 0.12	相乗
EGCg	0.47 ± 0.03	相乗
ミリセチン	0.56 ± 0.06	相乗
Q-3-G	0.61 ± 0.00	相乗
EC	0.62 ± 0.01	相乗
没食子酸	0.62 ± 0.02	相乗
ルチン	0.63 ± 0.02	相乗
カフェ酸	0.64 ± 0.06	相乗
カテキン	0.70 ± 0.02	相乗
モリン	0.71 ± 0.04	相乗
EGC	0.71 ± 0.01	相乗
プロトカテク酸	0.76 ± 0.10	相乗
ケルセチン	0.82 ± 0.05	相乗
フェルラ酸	1.01 ± 0.12	相加
ケンフェロール	1.24 ± 0.09	相殺

相乗効果大

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）
既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究
平成 25 年度分担研究報告書

酸化防止剤力価評価における DPPH 法と各種測定法との相関性に関する研究

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 法とその他測定法における活性値を比較検証することにより、DPPH 法の有用性を詳細に検討した。昨年度の研究では、DPPH 法と ABTS 法の比較を行い、カテコール化合物で活性値が異なることを明らかにし、その活性値の差が反応時の溶媒効果に起因することが示唆されている。そこで本年度は、DPPH 法での溶媒効果を明らかにするために、アセトニトリル系での活性測定を試み、水／エタノール系での活性値と比較した。その結果、アセトニトリル系では、カテコール化合物の活性値の低下が著しいことが判明し、水／エタノール系でのカテコール構造の再生が DPPH 法での活性値の増加の直接的原因である可能性が強く示唆された。続いて、DPPH 法と WST-1 法の活性値を比較検証した。その結果、両者の活性値に高い相関は得られなかったが活性傾向は類似していることが判明した。さらに、キサンチンオキシダーゼの阻害効果が WST-1 法の活性値に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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の確立を目指している。平成 17～19 年度、平成 20～22 年度の研究において、公定法候補の選定と妥当性について検討を加えている。公定法候補の選定に当たっては、(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 項目を重点条件としている。検討の結果、ラジカル消去活性測定法である DPPH 法と ABTS 法、スーパーオキシドアニオン消去活性測定法である WST-1 法を有力候補として挙げ、各測定法におけるプロトコルの最適化を試みるとともに、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、得られた結果を詳細に比較検討してきた。なお、プロトコルの最適化においては、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、テータ解析方法に至るまで詳細に検証し、公定法として妥当な条件を設定している。種々検討の結果、現時点では DPPH 法が公定法候補の最有力となっており、複数試験機関において共同試験等を実施し、その妥当性評価を進めている。

今後 DPPH 法を公定法として検討していく上で、他の測定法との反応特性の違いを明らかにしておく必要がある。昨年度の研究では、DPPH 法と ABTS 法における反応特性の違いを詳細に検討したが、本年度はさらに反応特性に影響を与える重