

表3 Glycyrrhizic acid市販試薬の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

a) データは、average ± standard deviation (n=3) で示した。

表4 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

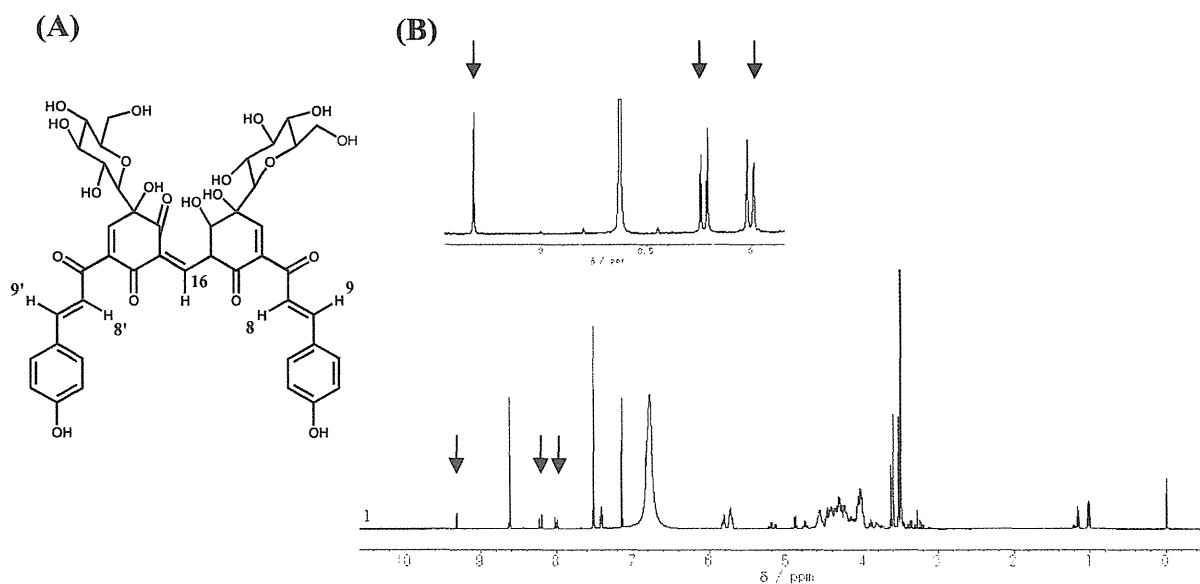


図1 (A) Carthaminの化学構造。(B) 「ベニバナ赤色素」 (Sample C) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。矢印は、低磁場側からH-16、H-8,8'、H-9,9' に由来するシグナルを示している。

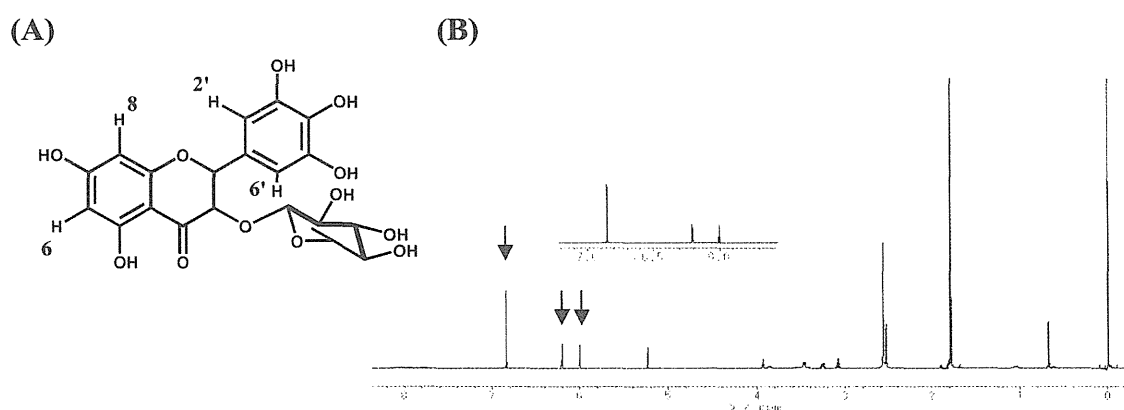


図2 (A) Myricitrinの化学構造。(B) Myricitrinの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。矢印は、低磁場側からH-2'、6'、H-8、H-6のシグナルを示している

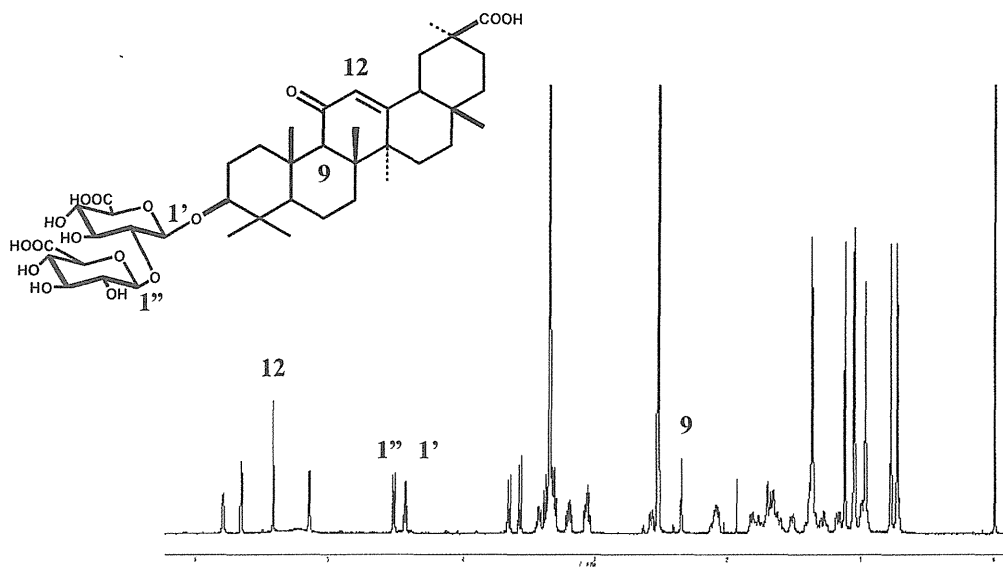


図3 Glycyrrhizic acid の構造と<sup>1</sup>H-NMRスペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz)

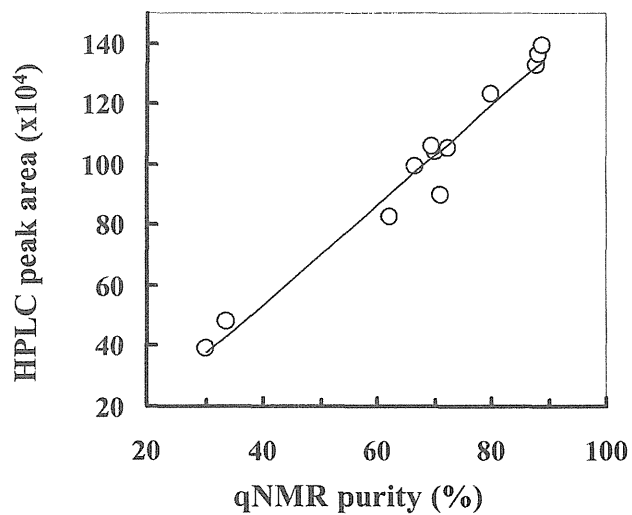


図4 市販glycyrrhizic acid試薬のqHNMR法を用いて測定した純度とHPLCクロマトグラム中のglycyrrhizic acidピークの面積の相関性

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 23-25 年度 総合分担研究報告書

カラメルⅢ中の 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾールの HPLC 及び LC/MS による分析法

研究協力者 秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 室長

分担研究者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部長

研究要旨 . カラメル III(アンモニウム化合物添加)に含まれる 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール (THI) を, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) と反応させてヒドラゾン (THI-DNPH) とした後に HPLC で分離して定量する純度試験において, 第 8 版食品添加物公定書の方法では夾雑物との分離が不十分であるため, カラム温度を 30℃ に固定して HPLC の移動相の条件を検討した. また, 8 版公定書の方法と定量値を比較し, さらに LC/MS で定量した場合と定量値との比較を行った. その結果, 移動相条件を変更した改良法で得られた定量値は第 8 版公定書の方法で得られた定量値より高い値を与えた. 別に LC/MS 法により定量分析を行った結果, 第 8 版公定書の方法で得られた定量値より高い値が得られたが, この値は改良法により得られた定量値と同等であった. この結果から本改良法は, 規格法より正確に定量できることが示唆された.

#### 研究協力者

山崎 壮 実践女子大学生活科学部食生活科学科 教授  
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 室長  
多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官  
伊藤 裕才 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

#### A. 研究目的

食品添加物色素のカラメル III(製造時にアンモニウム化合物添加)にはラットにおいてリンパ球減少作用などの免疫毒性が報告されている 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール (THI, Fig. 1) が検出される可能性がある<sup>1-3)</sup>, 日本の食品添加物規格のカラメル III の規格において, THI 定量法として 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH, Fig. 1) で誘導体化後に HPLC 法で定量する方法(第 8 版公定書の方法, 以下, 公定法)が純度試験に設定されている(資料参照)<sup>4,5)</sup>. この方法は Kröplien らに確立された方法で<sup>6)</sup>, JECFA 規格<sup>7)</sup>, EU 規格, FCC 規格でも同様の方法が定められている.

本法はカラメル III から 2 種類の陽イオン交換カラムを組み合わせたカラムで THI を精製した後, DNPH と反応させてヒドラゾン (THI-DNPH, Fig. 1) に誘導体化後に, オクチルカラムを用い

て0.1mol/Lリン酸/メタノール(1:1)を移動相とする HPLC 法で分離して定量する方法である。しかしながら、公定法では夾雑物との分離が不十分であることが多く、定量値の信頼性に問題点があった。また、JECFA 規格には粒子径 10  $\mu\text{m}$  の破碎型充填剤の HPLC 用オクチルカラムが推奨されているが、近年市販されている HPLC 用オクチルカラムは粒子径 5  $\mu\text{m}$  のビーズ状充填剤が一般的である。

そこで昨年度、広く市販されている HPLC 用オクチルカラムを用いて、THI-DNPH と不純物の分離と定量値の信頼性に対する移動相の影響やカラムの種類の影響を検討し、極大吸収波長 359 nm の不純物ピーク A と分離できた場合に正しい定量値が得られると考えられること、移動相比の違いによりこのピークとの分離が可能になること、同じ移動相比でもカラムにより分離パターンが異なることを見いだした。

今年度の本研究では、カラム温度を一定にした場合の分離を確認し、8 版公定書の方法と定量値を比較し、さらに LC/MS で定量した場合と定量値との比較を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試料、試薬および器具

カラメル III 製品は日本カラメル工業会より昨年度入手した6製品のうち1製品、H23-5A(粉末製品)を使用した。THI は日本カラメル工業会より入手した。リン酸、DNPH、メタノール、エタノールは特級の試薬を用いた。ただし HPLC の溶媒には HPLC 用メタノールを用いた。組み合わせカラムは公定書規格に合う物を製造して使用した。上部カラム充填剤として Amberlite CG-50 を、下部カラム充填剤として Dowex 50W-X8 を使用した。いずれも和光純薬工業から購入した。

### 2. 検液および THI-DNPH の調製

公定書の方法に従って製品から検液を調製し、また、THI から THI-DNPH を合成し、THI-DNPH をメタノールに溶解して 0, 10, 20, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  としたものを標準液として用いた。

### 3. HPLC 分析条件

HPLC 装置は Alliance Separations Module 2695 および Photodiode Array Detector 2996 (Waters)を用いた。以下の3種のオクチルカラムを使用した。

カラム A: LiChrosorb RP-8, 4.6 mm i.d.×250 mm, 10  $\mu\text{m}$  (GL Science)。

カラム B: TSKgel Octyl-80Ts, 4.6 mm i.d.×250 mm, 5  $\mu\text{m}$  (東ソー)。

カラム C: Wakosil-II 5C8 HG, 4.6 mm i.d.×250 mm, 5  $\mu\text{m}$  (和光純薬工業)。

カラム温度は 30℃とした。移動相は 0.1 mol/L リン酸/メタノール混液(7:3)とした。流量はカラム A では THI-DNPH の保持時間が  $6.3\pm 0.1$  min となるように 0.7 mL/min に調整し、カラム B および C では 0.8 mL/min とした。検出器の測定波長は 200–500 nm とし、定量では 385 nm とした。

### 4. LC/MS 分析条件

LC/MS 装置は ACQUITY UPLC/SQD system (Waters)を用いた。以下の3種の ODS カラムを使用した。

カラム D: L-column2 ODS, 2.1 mm i.d.×150 mm, 3  $\mu\text{m}$  (化学物質評価研究機構)。

カラム E: Inertsil ODS-4, 2.1 mm i.d.×150 mm, 3  $\mu\text{m}$  (GL Science)。

カラム F: TSKgel ODS-100V, 2.0 mm i.d.×150 mm, 3  $\mu\text{m}$  (東ソー)。

その他の条件は以下の通りである。カラム温

度:30℃, 移動相:0.1%ギ酸/メタノール混液(7:3), 流量:0.2 mL/min, イオン化:ESI positive, キャピラリー電圧:3.0 kV, コーン電圧:30 V, ソース温度:110℃, 脱溶媒温度:350℃, 脱溶媒ガス流量:800 L/hr, コーンガス流量:30 L/hr, 検出:SIR mode,  $m/z$  411.

## C. 研究結果および考察

### 1. カラム温度および移動相の検討

カラム A は粒径が 10  $\mu\text{m}$  の破碎型充填剤のオクチルカラム, カラム B とカラム C は粒径 5  $\mu\text{m}$  のビーズ状充填剤のオクチルカラムである. 粒径 5  $\mu\text{m}$  の典型的なオクチルカラムであるカラム B と予備検討により, 最も THI 含量が高いと判定された試料 H23-5A から調製した検液を用いて, カラム温度を 30℃, 移動相組成比は昨年度の検討で良好であった 0.1mol/L リン酸:メタノール = 7:3 に固定して検討を行った. その結果, 常温で行った昨年度と同様に THI-DNPH のピークが夾雑物のピーク A と完全に分離した. HPLC の移動相の改良として, 組成比 7:3 の条件を用いることが正確な定量値を得るためには適当と考えられた.

### 2. 公定法, 改良法および LC/MS 法による定量値の比較

試料 H23-5A から検液の調製を 3 回行い, 調製された 3 検液について粒子径 10  $\mu\text{m}$  の破碎型充填剤のカラム A を用い, THI-DNPH の保持時間が  $6.3 \pm 0.1$  min となるように流量を 0.7 mL/min に調整し試験した. これは公定法の測定条件である. 次に, 同一の 3 検液を用いて, 粒子径 5  $\mu\text{m}$  のカラム B およびカラム C を用いて改良移動相で試験した. 公定法および 2 種のカラムと改良移動相(0.1 mol/L リン酸/メタノール混液(7:3))で評価した典型的なクロマトグラムを Fig. 2 に

示した. カラム A を用いた公定法では THI-DNPH のピークはベースラインが大きく隆起している時間に溶出されたが, 改良法ではベースラインの隆起が生じなかった. 試料中の THI 含量を算出したところ, いずれの検液においても改良移動相を用いた方法が従来法と比べ高い定量値を示した(Table 1). また, 検液調製は従来規格試験法に従ったが, すべての定量値の標準偏差(SD)が小さいことから, 従来規格試験法の検液調製法には問題がないことが示唆された.

次に, 得られた定量値の妥当性を確認するため, LC/MS を用いた試験を行った. 従来規格試験法, 改良移動相を用いた方法, ODS カラムを用いた分析例<sup>8)</sup>の移動相はすべて不揮発性の酸であるリン酸を高い濃度で含有していることから, LC/MS には不適であるため, 揮発性の酸として 0.1%ギ酸を用い, 3 種の ODS カラムについて検討した. 先に調製された 3 検液における定量値を求めた結果, THI-DNPH は UV 385 nm 検出では夾雑物の影響によりベースラインが大きく隆起し, また夾雑物のピークとの分離が良好ではなかった. しかし, ESI ポジティブモードにおいて,  $[M+H]^+$  イオンである  $m/z$  411 を SIR 測定したところ, ほぼ単一のピークとして検出することができた(Fig. 3). SIR 測定による THI-DNPH のピーク面積から絶対検量線法により検液中の THI-DNPH 濃度を算出した. LC/MS を用いた方法においては, 3 種類の ODS カラムを用いて試料中 THI 含量を算出したが, 得られた定量値はいずれも同等な値を示した(Table 2).

LC/MS 法による定量値と, 従来規格試験法および改良法の定量値を比較したところ, 従来規格試験法が LC/MS 法と比べて有意な差ではないが若干低い値を示したが, 改良法は LC/MS 法と同等の値を示した(Table 2).

#### D. 結論

以上、カラメルⅢ中のTHIの日本の規格試験法においてTHIのピークと夾雑ピークとの分離が不十分であり、定量精度の改善が必要であったことから、昨年度移動相条件の最適化を検討し、今年度はさらに改良した。最適化された改良法による定量値の信頼性を検証するため、LC/MS法を用いて検討した結果、改良法が従来の規格試験法に比べ、正確な定量値を算出できることが示唆された。

#### E. 参考文献

- 1) Sinkeldam, E. J., de Groot, A. P., van den Berg, H., Chappel, C. I. : The effect of pyridoxine on the number of lymphocytes in blood of rats fed Caramel Colour III. *Food Chem. Toxicol.*, **26**, 195–203 (1988).
- 2) Kröplien, U., Rosdorfer, J., van der Greef, J., Long R. C., Jr., Goldstein, J. H., : 2-Acetyl-4(5)-(tetrahydroxybutyl)-imidazole: Detection in commercial caramel colour III and preparation by a model browning reaction. *J. Org. Chem.*, **50**, 1131–1133 (1985).
- 3) Houben G. F., Penninks A. H., 1994. Immunotoxicity of the colour additive Caramel Colour III; A review on complicated issues in the safety evaluation of a food additive. *Toxicology*, **91**, 289–302 (1994).
- 4) Japan's Specifications and Standards for Food Additives, 7th Ed., Ministry of Health and Welfare, Japan (1999).
- 5) Japan's Specifications and Standards for Food Additives, 8th Ed., Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (2007).
- 6) Kröplien, U.: Quantitative analysis of 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxybutylimidazole. *J.*

*Chromatogr.*, **362**, 286–290 (1986).

- 7) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 74th Session ed., “Compendium of food additive specifications”, Rome, FAO, 2011, p. 18-19. (ISBN 978-92-5-107004-8)
- 8) Sakamoto-Sasaki, S., Goda, Y., Maitani, T. : Content of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole in commercial caramel color products. *Jpn. J. Food Chem.*, **5**, 47–50 (1998).

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

T. Akiyama, W. Sekiguchi, N. Sugimoto, A. Tada, Y. Ito, T. Yamazaki, H. Akiyama, Revised method for analyzing, 2-acetyl-4-tetrahydroxy butylimidazole in caramel III, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **20**, 190-195 (2013).

##### 2. 学会発表

秋山卓美, 関口若菜, 山崎壮, 穠山浩, カラメルⅢ中 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾールの HPLC 分析法. 日本食品衛生学会第 103 回学術講演会(2012年5月, 東京).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

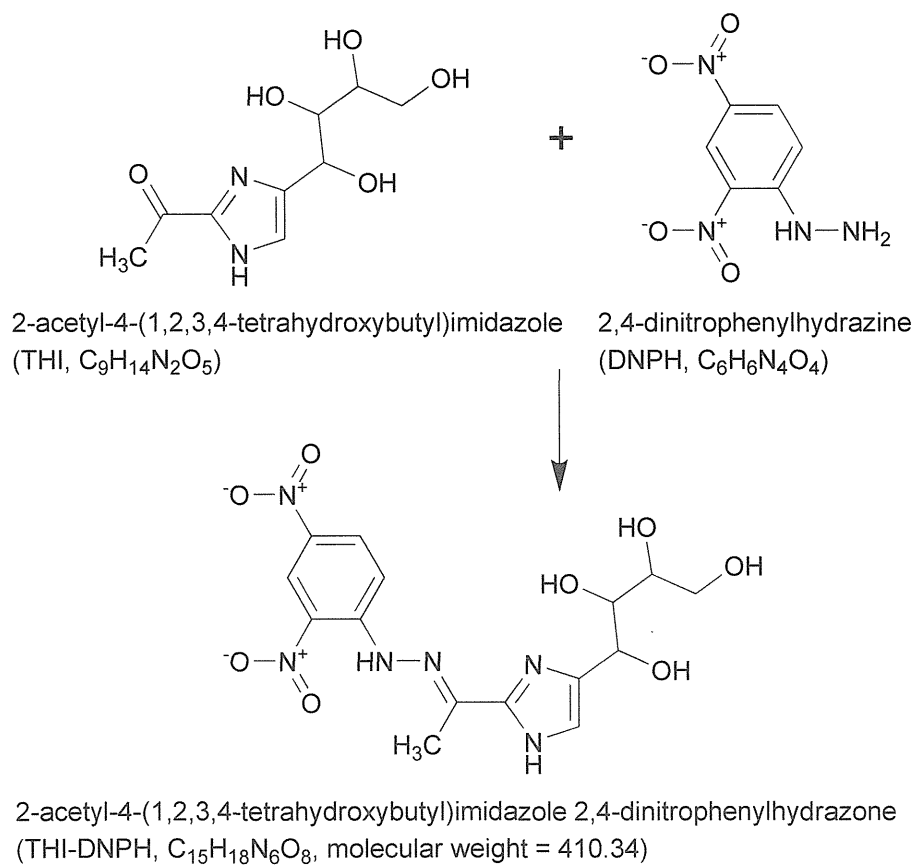


Fig. 1. Structure of 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole (THI).



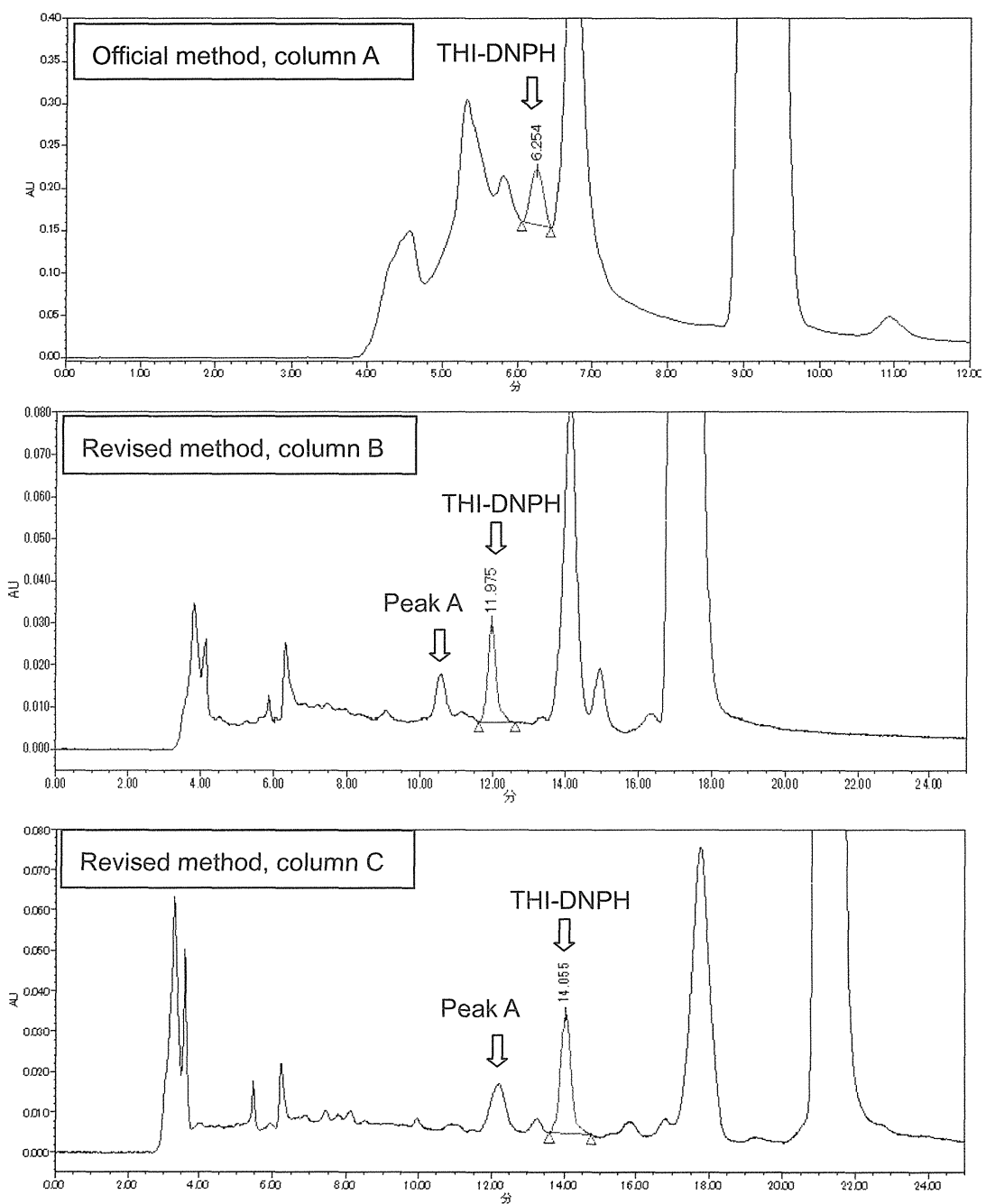


Fig. 2. HPLC chromatograms of test solution for official and revised methods.

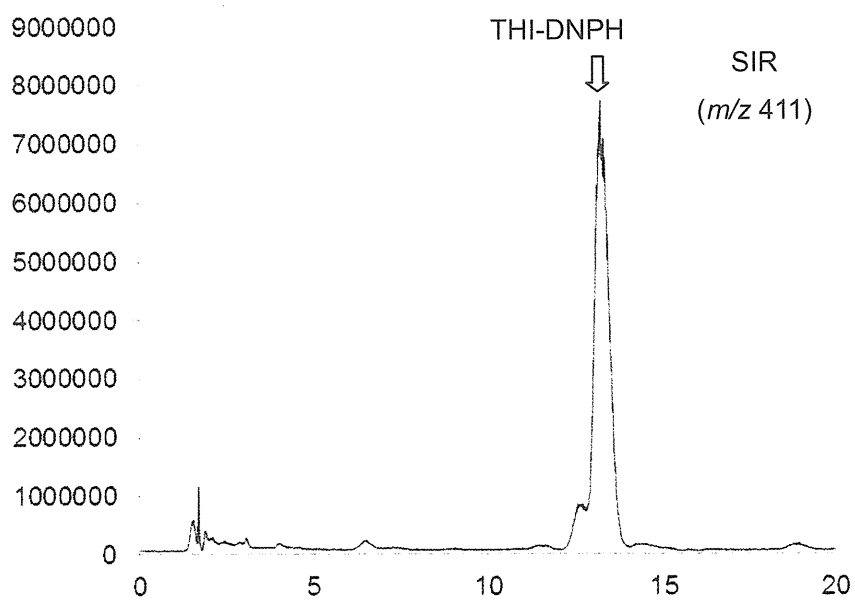
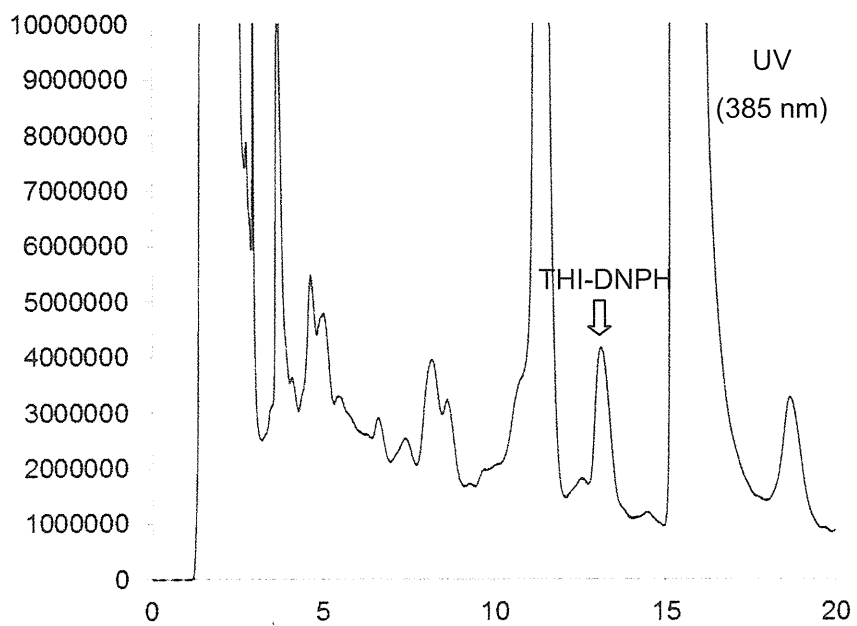


Fig. 3. LC/MS chromatograms of test solution separated with the column F.

Table 1. Amount of THI determined by the official method and the revised method.

Test solution	Method	Column	Amount of THI ( $\mu\text{g/g}$ , average $\pm$ SD)
1	Official	A	25.55 $\pm$ 1.44
	Revised	B	28.33 $\pm$ 0.65
		C	28.08 $\pm$ 0.07
2	Official	A	25.96 $\pm$ 2.33
	Revised	B	29.88 $\pm$ 0.89
		C	27.73 $\pm$ 0.12
3	Official	A	23.08 $\pm$ 0.37
	Revised	B	31.74 $\pm$ 0.31
		C	26.80 $\pm$ 0.09

Table 2. Amount of THI determined by the official method, the revised method and the LC/MS method.

Method	Column	Amount of THI ( $\mu\text{g/g}$ , average $\pm$ SD)
Official	A	24.86 $\pm$ 1.56
Revised	B	29.99 $\pm$ 1.71
	C	27.54 $\pm$ 0.66
LC/MS*	D	30.24 $\pm$ 1.61
	E	31.32 $\pm$ 1.57
	F	31.88 $\pm$ 1.51

\* Detected in SIR mode.

資料. 第 8 版食品添加物公定書純度試験(9)

(9) 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール  
40 $\mu$ g/g 以下(固形物換算)

(i) 装置 組合わせカラム

概略は次の図による。ただし、部品の接続部は標準すり合わせガラス接続とする。

A: 滴下漏斗(100ml)

B: テフロン製コック

C: ガラスカラム 内径 12.5mm, 長さ 150mm (接続部分を含む) 又は 内径 10mm, 長さ 200mm(接続部分を含む)

D: 弱酸性陽イオン交換樹脂(微粒)

E: 綿栓

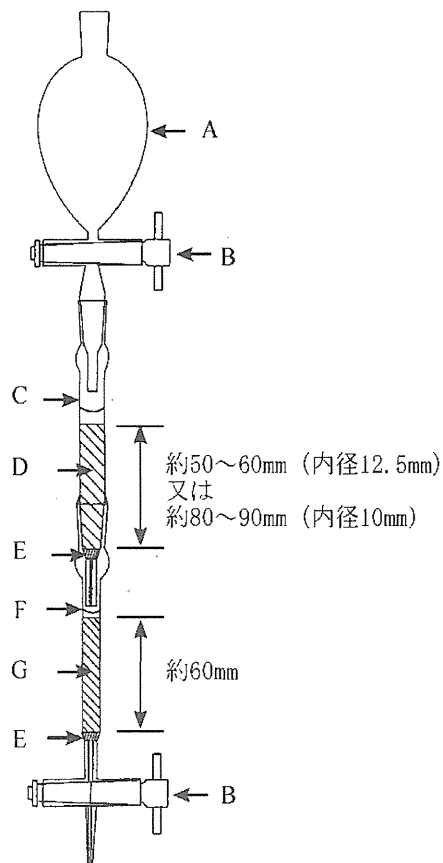
F: ガラスカラム 内径 10mm, 長さ 175mm (接続部分を含む)

G: 強酸性陽イオン交換樹脂(微粒)

(ii) 操作法

本品 0.20~0.25g を精密に量り, 水 3ml を加えて溶かし, 試料液とする。試料液を組合わせカラムの上側のカラム C に定量的に移す。カラムを

水約 100ml で洗浄する。上側のカラム C を外し, 滴下漏斗 A を下側のカラム F に接続した後, カラム F を 0.5mol/L 塩酸溶液で溶出する。最初の溶出液 10ml を捨て, その後に溶出液 35ml を集める。その溶液を 40 $^{\circ}$ C, 2.0kPa で乾燥状態まで濃縮する。そのシロップ状の残留物をカルボニル基除去メタノール 250 $\mu$ l で溶解し, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩試液 250 $\mu$ l を加える。その反応混合物をセプタムキャップ付きのガラス瓶に移し室温で 5 時間保管し, 検液とする。別に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 0.50g を塩酸 1ml に加えてかくはんした後, エタノール 10ml を加えて, 水浴上で溶液になるまで加熱する。2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 0.1g をその熱い溶液に加える。数分で 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの結晶化が始まり, 室温まで冷却し結晶化が完全になったら, ろ過分離する。この 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール-2,4-ジニトロフェニルヒドラジンをエタノール 5ml 当たり塩酸 1 滴を加えたエタノールから再結晶することにより精製する。精製した結晶をろ過分離し, デシケーター中で乾燥する。この約 0.01g を精密に量り, カルボニル基除去メタノールで正確に 100ml とする。この溶液をカルボニル基除去メタノールで希釈して, 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu$ g/ml の標準液を調製する。検液及び標準液をそれぞれ 5 $\mu$ l ずつ量り, 次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。それぞれの標準液のピーク面積を測定し, 検量線を作成する。検液のピーク面積を測定し, 検量線を用いて 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾールの量を求める。ただし,



2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン 100 $\mu$ g/ml は 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 47.58 $\mu$ g/ml に相当する。

操作条件

検出器 紫外吸光光度計(測定波長 385nm)

カラム充てん剤 10 $\mu$ m の液体クロマトグラフィー用オクチルシリル化シリカゲル

カラム管 内径 4.6mm, 長さ 25cm のステンレス管

カラム温度 常温

移動相 0.1mol/L リン酸/メタノール混液(1:1)

流量 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの保持時間が  $6.3 \pm 0.1$  分となるように調整する。

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～平成 25 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

研究協力者 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

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 石附 京子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

#### 研究要旨

既存添加物に分類される酸化防止剤に対して抗酸化力価に基づく規格基準を設定することを目的とし、DPPH 法の標準法としての適用性について検討した。まず、DPPH 法に関する複数機関での評価研究の結果を再解析することにより、DPPH 法の室内再現性、および室間再現性が優れていることを明らかとした。また、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を調べた結果、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、有効成分含量と抗酸化力価との間に有意な相関が認められた。このことより、DPPH 法の標準法としての有用性が示された。続いて、有効成分や有効成分組成に不明な点が多いカンゾウ油性抽出物について、成分含量と抗酸化力価との関連について調べた。測定に用いた 8 種類のカンゾウ油性抽出物全てに抗酸化活性を確認することができたが、既知成分の抗酸化活性への寄与率は極めて低かった。抗酸化成分の全容解明には時間を要すると予想されるため、有効成分に不明な点が多い既存添加物については、抗酸化力価を規格基準として設定することが望ましいと考えられた。また、簡易・迅速な脂質過酸化抑制能評価法の確立を目的とし、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た。

#### 研究成果の総括

##### 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、あるいは成分組成を指標とした規格基準の設定が必要である。従って、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、およ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。このことから、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、平成 17-19 年度の前事業では、ラジカル消去活性測定法である 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法と 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 法、活性酸素種消去活性測定法である 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (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。また、単一化合物からなる 9 種類の酸化防止剤を試料とし、予備的な小規模共同試験（試験機関：3 か所）を実施した。

続いて、平成 20-22 年度の前事業では、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うと共に、改良プロトコルに則った DPPH 法を用いて、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*- $\alpha$ -トコフェロール）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 か所の複数機関にて評価し、DPPH 法の標準法としての妥当性確認を行った。

しかし、先の複数機関による評価研究では、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、平成 23-25 年度の本事業では、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<sub>50</sub> 値を用いて再解析を行った。また、有効成分、および有効成分組成の特定が困難である既存添加物に対して抗酸化力価に基づく規格基準を設定することを最終目標とし、実際の既存添加物の抗酸化力価評価に DPPH 法を適用し、有効成分含量と抗酸化力価との関連について調べた。加えて、簡易・迅速な脂質過酸化抑制能評価法の開発にも取り組んだ。

## B. 研究方法

### (1) 複数機関による評価研究

試験機関 14 か所にて試験を行った。分析試料には、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*- $\alpha$ -トコフェロール、ならびに Trolox（Sigma-Aldrich 製）を使用した。下記に記す DPPH 法にて抗酸化力価を求め、各試験機関の報告値について統計処理を行った。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<sub>T</sub>)、室間再現標準偏差 (SD<sub>R</sub>)、室内再現相対標準偏差 (RSD<sub>T</sub>)、室間再現相対標準偏差 (RSD<sub>R</sub>)、RSD 比 (RSD<sub>R</sub>/RSD<sub>T</sub>) を算出した。データの解析には Microsoft Office Excel 2010 を使用した。

### (2) DPPH ラジカル消去活性測定法

#### 2-1. 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  $\mu$ L と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

試料溶液添加時の吸光度を A<sub>s</sub>、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<sub>c</sub> 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。

## 2-2. IC<sub>50</sub>の算出方法

各試料の IC<sub>50</sub> 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回の繰り返し測定で求められた③の値の平均値を求めた。これを試料の IC<sub>50</sub> (μg/mL) とした。

## 2-3. Trolox 等価活性算出方法

試料の IC<sub>50</sub> が Trolox の IC<sub>50</sub> 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 =

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

## (3) チャ抽出物の抗酸化力価評価とカテキン類の定量

### 3-1. 分析試料と抗酸化力価評価

分析試料には日本添加物協会より提供されたチャ抽出物 30 種類を用い、上記の DPPH 法により抗酸化力価評価を行った。

### 3-2. カテキン類の定量

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. × 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℃、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)。

## (4) カンゾウ油性抽出物の抗酸化力価評価と活性成分の分画

### 4-1. 分析試料と抗酸化力価評価

分析試料には日本食品添加物協会を通じて供与されたカンゾウ油性抽出物 8 種類を用い、上記の DPPH 法により抗酸化力価評価を行った。

### 4-2. カンゾウ油性抽出物の HPLC による分画

カンゾウ油性抽出物の HPLC による分画は下記の条件で実施した。保持時間 0.3 分～59.6 分にかけて、4.5 mL (約 56 秒) ごとに分画し、計 64 画分を分取した。HPLC カラム：Inertsil ODS-3 (10 × 250 mm, 5 μm, GL Science 製)、カラム温度：35℃、移動相：0.05% ギ酸を含むアセトニトリル、アセトニトリル濃度 (gradient)：30% (0-3 分) → 80% (-53 分) → 90% (54-60 分) → 30% (62-75 分)、流速：5 mL/min、注入量：400 μL、検出：200-500 nm。分取 HPLC 装置 (島津製作所製) の構成は下記の通りであった。LC：LC-10AD、system controller：SCL-10A VP、degasser：DGU-12A、auto injector：SIL-10A、diode array detector：SPD-M10AVP、column oven：CTO-10A、fraction collector：FRC-10A。

### (5) シークエンシャルインジェクション法による脂質過酸化抑制能評価

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。SIA 装置動作手順は専用ソフトにプログラムを入力することにより制御した。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。

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

TEAC の算出には DPPH 法と同様の式を用いた。

### (6) ロダン鉄法 (バッチ法)

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 分間超音波処理し、0.1%リノール酸混合溶液を調製した。その後、試験管に 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 500  $\mu$ L、0.1%リノール酸混合溶液 1 mL、100 mM AAPH 200  $\mu$ L、試料溶液 800  $\mu$ L 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  $\mu$ L、30%チオシアン酸アンモニウム水溶液 100  $\mu$ L、3.5%塩酸溶液で調製した 20 mM 塩化鉄 (II) 溶液 100  $\mu$ L を順次添加し、10 秒間のピペ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。

### C. 研究結果およびD. 考察

#### (1) 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 -

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 (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) 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。先の報告では、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<sub>50</sub> 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、DPPH 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。

#### (2) DPPH 法の既存添加物への適用

##### 2-1. チャ抽出物

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、ウーロン茶抽出物を除く 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 (カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレート、エピガロカテキンガレート) 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が全体の約 87%であることを明らかとした。残り 13%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 ( $r = 0.984$ ,  $n = 29$ ) を見出すことができた。本成果は、従来の成分量を用いた規格基準に代わり、DPPH 法を標準法とする抗酸化力価を規格基準として設定する上で、重要な根拠になり得ると考えられた。

##### 2-2. カンゾウ油性抽出物

上記のチャ抽出物に続いて、有効成分や有効成分組成に不明な点が多いカンゾウ油性抽出物の抗酸化力価と主要成分含量との関係を調べた。その結果、測定に用いた 8 種類全てのカンゾウ油性抽出物に抗酸化活性を確認することができた。しかし、既知主要成分 (glabridin, Isoliquiritigenin, および licochalcone A) の抗酸化活性に対する寄与率は極めて低かった (寄与率 4.6–54%)。現在、抗酸化活性を有する未知成分の単離・同定が進められているが、全容解明には時間を要すると予想される。従って、カンゾウ油性抽出物のような有

効成分に不明な点が多い既存添加物については、抗酸化力価を規格基準として設定することが望ましいと考えられた。

### (3) 新規脂質過酸化抑制能評価法の開発

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除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。しかし、バッチ法の脂質過酸化抑制能評価法は、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。そこで本研究では、SIA 法を代表的な脂質過酸化抑制能評価法であるロダン鉄法に適用し、測定時間の短縮、ならびに測定自動化を試みた。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（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行ったところ、全ての試料において  $IC_{50}$  と Trolox 等価活性 (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 ( $r = 0.993$ ,  $n = 10$ ) が認められた。このことから、本 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唆された。

### D. 結論

DPPH 法に関する複数機関での評価研究の再解析により、本事業で確立したプロトコルの妥当性が確認された。また、チャ抽出物への DPPH 法の適用の結果より、DPPH 法が広い適用範囲を有していること、かつ有効成分含量と抗酸化力価の間に有意な相関があることが明らかとなった。本成果は、従来の成分量を用いた規格基準に代わり、DPPH 法を標準法とする抗酸化力価を規格基準として設定する上で、重要な根拠になり得ると考えられた。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。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Moonrungsee, N., Shimamura, T., Kashiwagi, T., Jakmune, J., Higuchi, K., Ukeda, H. Sequential injection spectrophotometric system for evaluation of mushroom tyrosinase-inhibitory activity. *Talanta*, 101, 233-239 (2012).

Moonrungsee, N., Shimamura, T., Kashiwagi, T., Jakmune, J., Higuchi, K., Ukeda, H. An automated sequential injection spectrophotometric method for evaluation of tyramine oxidase inhibitory activity of some flavonoids. *Talanta*, 122, 257-263 (2014).

#### 2. 学会発表

Determination of lipid hydroperoxide in oil samples employing spectrophotometric sequential injection analysis system.

Ponhong, K., Shimamura, T., Higuchi, K., Kashiwagi, T., Grudpan, K., Motomizu, S., Ukeda, H. Flow analysis XII, Thessaloniki, Greece (2012. 9).

Sequential injection spectrophotometric assay of lipid hydroperoxide. Ponhong, K., Shimamura, T., Higuchi, K., Kashiwagi, T., Grudpan, K., Motomizu, S., Ukeda, H. 第 50 回フローインジェクション分析講演会, 徳島 (2012. 11).

### H. 知的財産権の出願・登録状況

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）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 23 年度～平成 25 年度分担総合研究報告書

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

複数の酸化防止剤を利用する場合あるいは天然抽出物を用いる場合には、抗酸化物の相互作用を把握することが重要となる。本研究では Median effect analysis を活用して、抗酸化物（酸化防止剤）の併用効果の解析を試みた。DPPH 法の結果に基づき、2 種類の抗酸化物の併用効果（相殺・相加・相殺効果）を解析した結果、トコフェロール類と相乗効果を発現する組合せを明らかにした。また、用いる抗酸化能評価法により、判定結果が異なることを示した。さらに、チオール化合物による相乗効果の発現挙動を明らかにし、抗酸化物併用時に生じる相互作用について重要な知見を得た。

## 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、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』<sup>1)</sup>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。しかしながら、検討した抗酸化物の組合せは限定されたものであったため、本研究期間においては、抗酸化物の組合せを網羅的に検討するとともに、相乗効果の発現メカニズムに関する因子の解明を試みた。

## 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）、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -トコフェロ

ール、 $\gamma$ -トコフェロール、 $\delta$ -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  $\mu$ L、100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 800  $\mu$ 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 IC<sub>50</sub> ( $\mu$ 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 ( $\mu$ mol TE/ $\mu$ 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  $\mu$ 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 IC<sub>50</sub> ( $\mu$ mol/mL) をそれぞれ求め、トロロックス等価活性 TEAC ( $\mu$ mol

TE/ $\mu$ 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 IC<sub>50</sub> 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. 研究結果および D. 考察

まず、4 種のトコフェロール類を中心とした併用効果の解析を計 51 通りの組合せで検討した。 $\alpha$ -トコフェロールでは 21 の組合せ、 $\gamma$ -トコフェロールでは 20 の組合せで併用効果を確認した結果、相乗効果を示す組合せが多数 (CI 値が 0.9 以下の組合せは計 19 通り) 確認された。EGCg・ECg などのカテキン類との組合せでは比較的強い相乗効果が認められた。EGCg は、 $\alpha$ -トコフェロキシルラジカルの  $\alpha$ -トコフェロールへの再生効果が大きいことが、ESR を用いた研究により明らかにされていることから、本実験で認められた相乗効果も ECg 及び EGCg による  $\alpha$ -トコフェロール再生効果に起因する可能性が高いと推察された。(平)

これまでの一連の研究では、DPPH 法で得られた測定結果を薬剤の併用効果判定に汎用されている Median effect analysis を用いて解析してきたが、用いる抗酸化能評価法により、対象となる抗酸化物の反応特性が異なることが予想され、結果として併用時の解析結果が異なる可能性が考えられたこ