

Table 1. LC/MS conditions

LC/MS system	Waters LC : Alliance 2695, PDA : 2996 photodiode array detector, MS : micromass ZQ
Column	J's sphere ODS-H80 (2.0 mm i.d.×150 mm, 4μm, YMC)
Column temp.	40°C
Solvent	A : 0.1%HCOOH/H ₂ O B : 0.1%HCOOH/MeOH gradient : B 35%(0min) → 80%(13-15min)
Flow rate	0.2 mL/min
Injection volume	5 μL
PDA scan	190-700 nm
Capillary voltage	3.0 kV (Pos.), 2.5 kV (Neg.)
Cone voltage	20 V (Pos.), 30 V (Neg.)
Source temp.	120°C
Desolvation temp.	350°C
Desolvation gas flow	400 L/hr
Cone gas flow	50 L/hr
Ion mode	ESI
MS scan	<i>m/z</i> 100-1000

Table 2. LC/TOF-MS conditions

LC/MS system	Waters UPLC : ACQUITY H-CLASS, PDA : ACQUITY eλ, TOF-MS : Xevo-G2 QTof
Column	ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d.×50 mm, 1.7μm, Waters)
Column temp.	40°C
Solvent	A : 0.1%HCOOH/H ₂ O B : 0.1%HCOOH/MeCN gradient : B 5%(0min) → 30%(7-10min)
Flow rate	0.3 mL/min
Injection volume	2 μL
PDA scan	210-600 nm
Capillary voltage	3.0 kV (Pos.), 2.5 kV (Neg.)
Cone voltage	30 V
Source temp.	120°C
Desolvation temp.	450°C
Desolvation gas flow	800 L/hr
Cone gas flow	50 L/hr
Ion mode	ESI
MS scan	<i>m/z</i> 100-1000

Table 3. LC/MS spectral data

		Retention time (min)	Observed			Calculated				
			ESHMS pos.	ESHMS neg.	UV λmax (nm)	Molecular formula	[M+H] ⁺	Difference (mDa)	[M-H] ⁻	Difference (mDa)
LC/MS										
Carminic acid	peak-A	6.8	493	491	276, 492					
S-14N	peak-B	8.9	492	490	274, 525, 563					
S-15N	peak-C	8.9	493	491	274, 525, 563					
LC/TOF-MS										
Carminic acid	peak-A	4.0	493.0977	491.0824		C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	493.0982 [†]	-0.5	491.0826 [†]	-0.2
S-14N	peak-B	4.7	492.1125	490.0983		C ₂₂ H ₂₁ ¹⁴ NO ₁₂	492.1142 [†]	-1.7	490.0986 [†]	-0.3
S-15N	peak-C	4.7	493.1108	491.0962		C ₂₂ H ₂₁ ¹⁵ NO ₁₂	493.1112 [†]	-0.4	491.0956 [†]	+0.6

Table 4. ^{13}C - T_1 of carminic acid and acid-stable carmine (S-14N, S-15N, H-14N)
 Red : max value in the same column

Sample	Carminic acid		S-14N		S-15N		H-14N	
	30°C		30°C		30°C		50°C	
Position	δ [ppm]	T_1 [s]	δ [ppm]	T_1 [s]	δ [ppm]	T_1 [s]	δ [ppm]	T_1 [s]
10	186.5	0.14	180.4	0.59	180.4	0.23	181.2	0.07
9	186.0	0.14	177.0	0.66	176.9	0.30	186.2	0.07
COO	169.8	0.53	172.1	1.30	172.3	0.85	169.1	0.26
6	161.9	0.40	161.1	0.75	160.6	0.56	158.1	0.35
1	160.5	0.49	169.1	0.68	169.2	0.42	159.3	0.37
3	155.1	0.66	167.9	0.84	167.9	0.56	152.6	0.52
4	148.7	0.73	146.1	0.73	146.2, 146.1	0.68	139.3	0.50
8	143.4	0.37	142.3	0.52	142.1	0.50	140.0	0.32
4b	135.9	0.55	137.7	0.62	137.6	0.68	138.4	0.40
7	130.6	0.88	128.8	1.02	129.4	1.17	131.0	0.84
8a	122.8	0.73	124.4	0.73	124.4	0.91	123.3	0.60
2	121.1	0.94	112.7	1.43	112.8	1.63	118.7	0.85
5	112.8	0.33	111.4	0.32	111.3	0.39	111.7	0.26
4a	111.8	0.78	104.9	0.86	104.9	1.07	107.3	0.75
8b	105.4	0.86	101.8	0.82	101.9	1.01	106.8	0.69
CH ₃	20.7	0.23	21.4	1.30	21.3	0.14	20.4	0.10
C-glucose								
5'	81.9	0.56	81.0	0.58	80.9	0.65	81.4	0.46
3'	79.1	0.56	79.7	0.58	79.6	0.66	78.2	0.48
1'	74.0	0.48	75.0	0.53	75.0	0.58	74.9	0.39
2'	71.0	0.48	70.5	0.56	70.6	0.58	72.8	0.43
4'	70.8	0.50	69.9	0.55	70.0	0.56	69.7	0.43
6'	61.7	0.22	60.6	0.27	60.7	0.23	60.5	0.20

Table 5. ^{13}C -NMR chemical shifts (δ , ppm) assignment of carminic acid

	literature				this study			
	Sugimoto et al. ¹⁾	Ishida et al. ⁶⁾	Schmitt et al. ⁷⁾	Schulze et al. ⁸⁾	a	b (Fig. 3)	c	d
	Carminic acid				Carminic acid			
Sample	—	220mg/mL	30mg/mL 10mm-tube	—	400mg/mL, 5mm-tube	400mg/mL, 5mm-tube	20mg/mL, 5mm-tube	20mg/mL, 5mm-tube
Solvent	DMSO-d ₆	DMSO-d ₆	DMSO-d ₆	D ₂ O/TFA, 50°C	DMSO-d ₆ , 30°C	DMSO-d ₆ , 50°C	DMSO-d ₆ , 30°C	DMSO-d ₆ , 1%TFA,30°C
δ reference	solvent	TMS	TMS	DSS	native scale	native scale	native scale	native scale
^{13}C -Magnet	125MHz	—	100MHz	100MHz	200MHz cryo probe	200MHz cryo probe	150MHz	200MHz cryo probe
Position	Chemical shift (δ , ppm)				Chemical shift (δ , ppm)			
10	186.2	185.9	186.2	184.2	186.5	186.6	187.2	186.8
9	186.1	184.7	186.0	183.9	186.0	186.1	186.5	186.7
COO	168.0	170.0	167.9	169.8	169.8	169.7	169.3	168.6
6	157.7	166.3	159.8	156.7	161.9	162.2	164.0	158.3
1	159.8	160.6	157.9	158.1	160.5	160.5	160.2	160.4
3	154.0	155.7	154.0	152.8	155.1	154.9	154.5	154.6
4	147.5	149.1	147.6	146.3	148.7	148.8	148.1	148.1
8	139.9	146.6	140.1	141.7	143.4	143.7	144.5	140.5
4b	135.7	135.3	135.6	134.5	135.9	136.0	136.2	136.2
7	132.1	127.0	131.9	122.3	130.6	130.5	129.6	132.7
8a	123.2	121.3	123.1	129.6	122.8	122.9	122.3	123.7
2	121.3	120.2	121.3	119.1	121.1	121.3	121.8	121.9
5	111.3	113.1	111.4	111.2	112.8	112.9	113.3	112.0
4a	111.4	111.2	111.3	110.5	111.8	111.9	112.0	111.9
8b	105.4	104.5	105.0	104.9	105.4	105.6	105.7	105.6
CH ₃	19.9	20.5	19.8	19.1	20.7	20.6	20.7	20.4
C-glucose								
5'	81.8	70.2	70.3	80.5	81.9	81.9	82.3	82.3
3'	78.7	78.6	78.6	77.8	79.1	79.1	79.3	79.2
1'	73.2	73.6	73.2	73.4	74.0	74.1	73.9	73.8
2'	70.3	70.0	70.4	71.3	71.0	71.1	70.9	70.9
4'	70.4	81.4	81.7	69.8	70.8	70.8	71.0	71.0
6'	61.3	61.1	61.3	61.1	61.7	61.7	61.9	61.9

Table 6. ¹³C-NMR chemical shifts (δ , ppm) assignment of acid-stable carmine

Article	literature		this study									
	Sugimoto et al. ¹⁾	Stathopoulou et al. ¹¹⁾	e	f	g	h	i	j	k (Fig. 7)	l	m	n
Sample	Acid stable carmine		S-14N		S-15N			H-14N			H-15N	
	—	5mm-tube	400mg/mL, 5mm-tube	400mg/mL, 5mm-tube	400mg/mL, 5mm-tube	20mg/mL, 5mm-tube	20mg/mL, 5mm-tube	400mg/mL, 5mm-tube	400mg/mL, 5mm-tube	20mg/mL, 5mm-tube	400mg/mL, 5mm-tube	20mg/mL, 5mm-tube
Solvent	DMSO-d ₆	CD ₃ OD /1%TFA	DMSO-d ₆ , 30°C	DMSO-d ₆ , 50°C	DMSO-d ₆ , 30°C	DMSO-d ₆ , 30°C	DMSO-d ₆ , 1%TFA,30°C	DMSO-d ₆ , 30°C	DMSO-d ₆ , 50°C	DMSO-d ₆ , 30°C	DMSO-d ₆ , 30°C	DMSO-d ₆ , 30°C
δ reference	solvent	TMS	native scale	native scale	native scale	native scale	native scale	native scale	native scale	native scale	native scale	native scale
¹³ C-Magnet	125MHz	150MHz	200MHz cryo probe	200MHz cryo probe	200MHz cryo probe	200MHz	200MHz cryo probe	200MHz cryo probe	200MHz cryo probe	150MHz	200MHz	150MHz
Position	Chemical shift (δ , ppm)		Chemical shift (δ , ppm)		Chemical shift (δ , ppm)			Chemical shift (δ , ppm)			Chemical shift (δ , ppm)	
10	180.1	186.3	180.4	180.6	180.4	180.7	181.2	181.1	181.2	181.2	181.1	181.2
9	175.5	182.0	177.0	177.6	176.9	177.1	186.3	186.1	186.2	186.2	186.1	185.9
COO	171.0	171.4	172.1	172.0	172.3	171.2	169.0	169.2	169.0	168.9	169.1	169.0
6	164.1	—	161.1	161.6	160.6	163.8	158.1	158.0	158.1	158.1	158.0	158.3
1	169.7	157.6	169.1	168.5	169.2	168.8	159.5	159.3	159.3	159.5	159.3	159.8
3	169.2	151.3	167.9	167.0	167.9	167.5	152.7	152.6	152.6	152.8	152.6	153.2
4	145.9	—	146.1	145.6	146.2, 146.1	145.6, 145.5	140.0, 139.9	139.7	139.7	140.0	139.75, 139.69	140.2, 140.1
8	144.0	140.2	142.3	142.9	142.1	143.9	139.7	139.9	140.0	139.7	139.9	139.9
4b	137.2	—	137.7	137.8	137.6	137.8	138.4	138.3	138.4	138.4	138.4	138.4
7	125.7	129.6	128.8	128.4	129.4	126.8	131.2	130.9	131.0	131.2	131.0	131.0
8a	123.4	123.2	124.4	124.3	124.4	123.7	123.1	123.1	123.3	123.2	123.2	123.2
2	110.8	116.7	112.7	113.0	112.8	112.4	119.0	118.6	118.7	119.0	118.7	118.8
5	110.8	110.7	111.4	111.5	111.3	111.5	111.5	111.5	111.7	111.5	111.6	111.6
4a	104.0	—	104.9	105.2	104.9	104.9	107.0	107.1	107.3	107.0	107.1	106.9
8b	99.9	—	101.8	102.2	101.9	101.5	106.7	106.7	106.8	106.6	106.7	106.5
CH ₃	20.9	19.1	21.4	21.2	21.3	21.3	20.5	20.6	20.4	20.6	20.6	20.6
C-glucose												
5'	80.5	80.9	81.0	81.0	80.9	81.2	81.5	81.4	81.4	81.5	81.4	81.5
3'	79.3	77.8	79.7	79.6	79.6	79.7	78.2	78.1	78.2	78.2	78.1	78.2
1'	74.7	74.9	75.0	75.1	75.0	75.2	74.7	74.8	74.9	74.7	74.8	74.7
2'	70.0	72.7	70.5	70.8	70.6	70.8	72.5	72.7	72.8	72.5	72.7	72.5
4'	70.0	69.3	69.9	70.2	70.0	70.7	69.6	69.6	69.7	69.6	69.6	69.7
6'	60.6	60.0	60.6	60.8	60.7	61.3	60.4	60.4	60.5	60.4	60.4	60.4

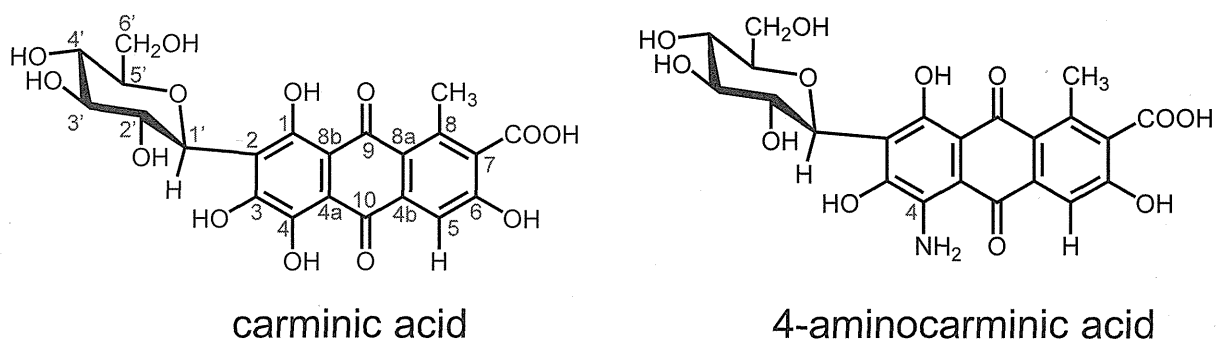


Fig. 1. Structure of carminic acid and 4-aminocarminic acid

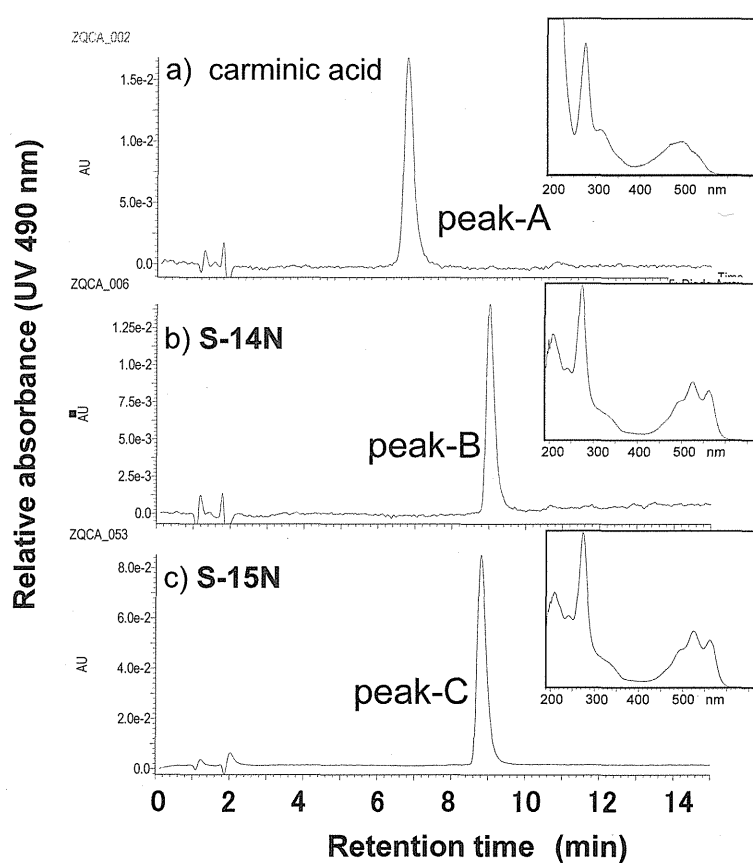


Fig.2. HPLC and PDA spectral profiles of (a)carminic acid, (b)S-14N and (c)S-15N

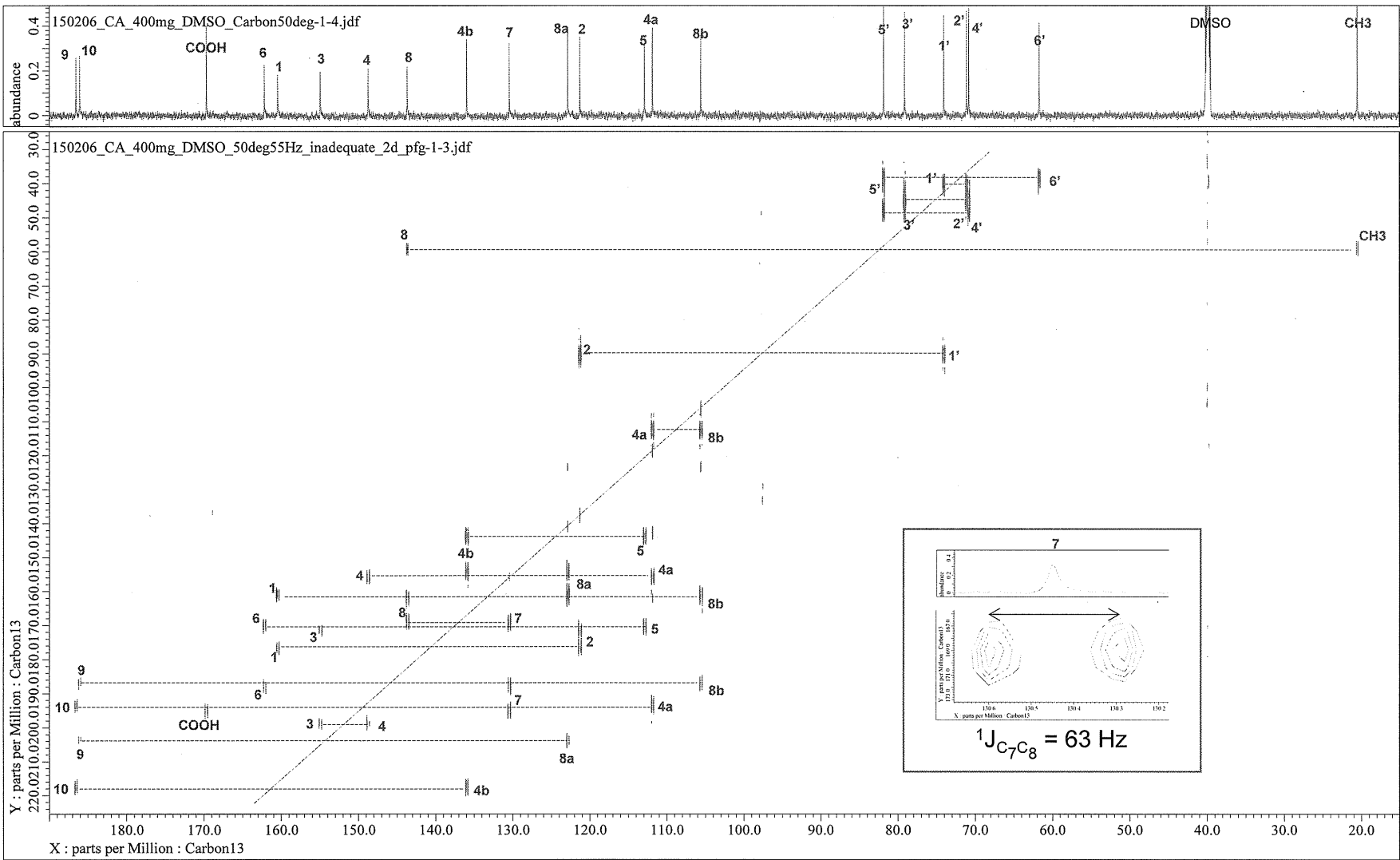
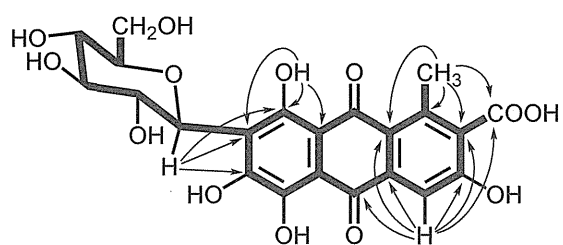
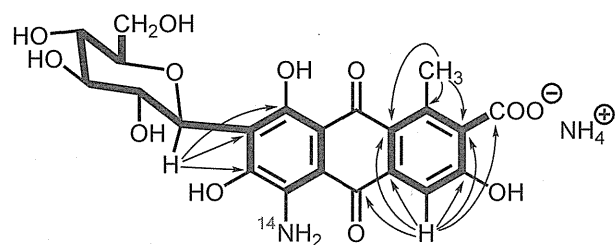


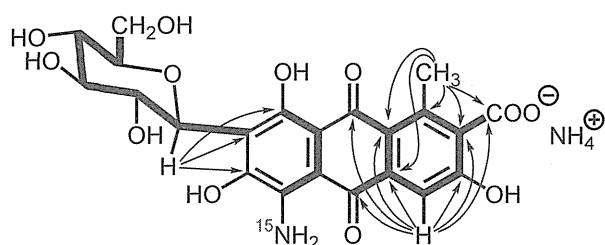
Fig. 3. 2D-INADEQUATE spectrum of carminic acid
 400 mg/mL (DMSO- d_6), 50°C, $^1J_{cc} = 55 \text{ Hz}$, scan = 1100, total acquisition time 3 days



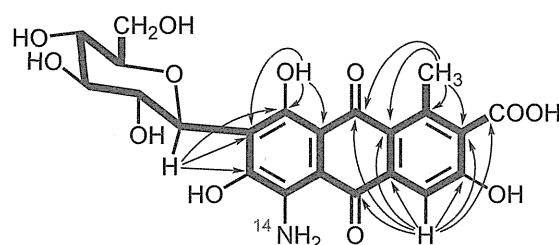
a) carminic acid



b) S-14N



c) S-15N



d) H-14N

Fig. 4. Observed INADEQUATE and HMBC correlations on (a) carminic acid and acid-stable carmine (4-aminocarminic acid): (b) S-14N, (c) S-15N and (d) H-14N
2D-INADEQUATE : bold line, HMBC : arrow

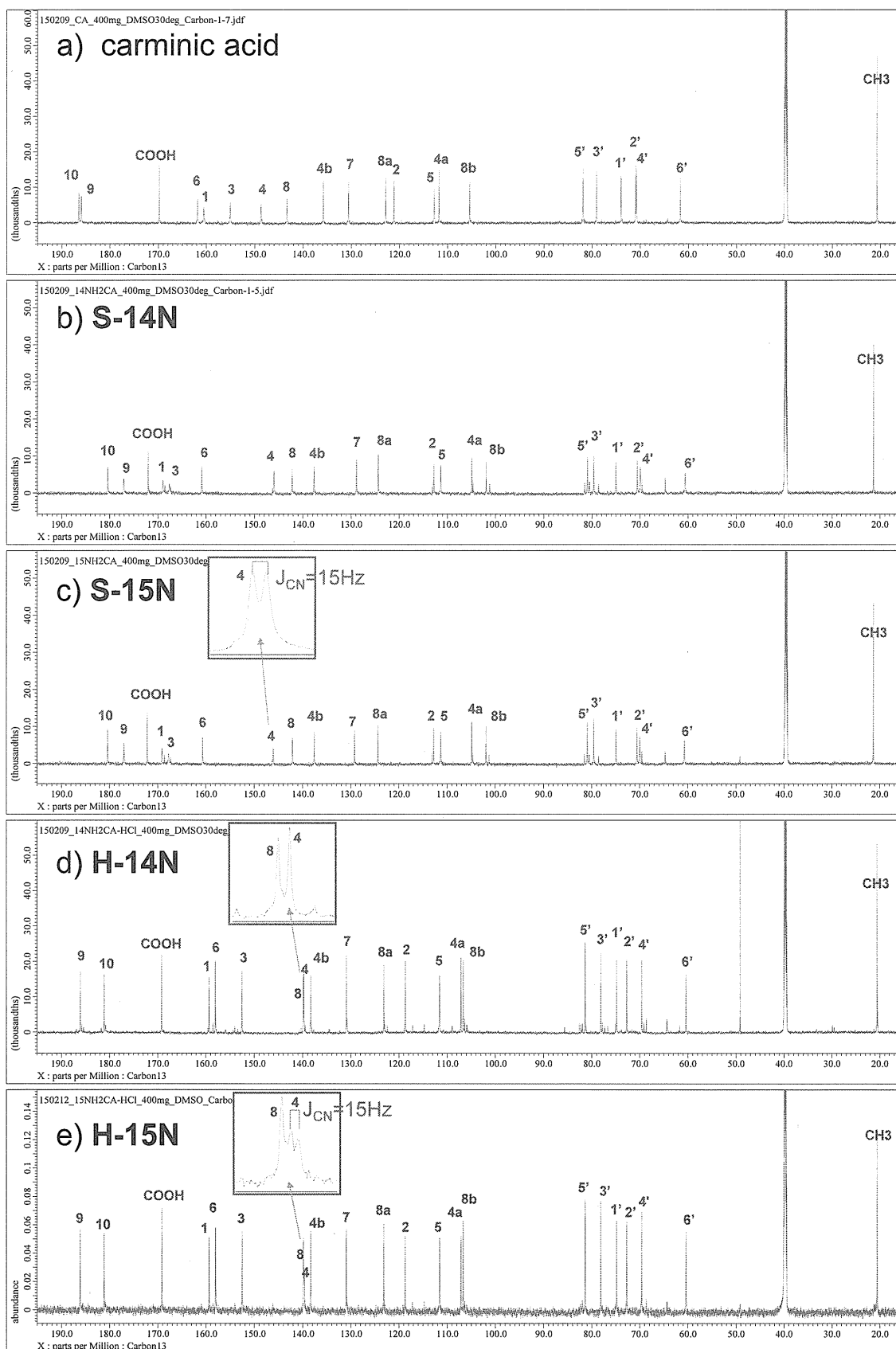


Fig. 5. The $1D-^{13}C$ NMR spectra of (a)carminic acid, acid-stable carmine:(b)S-14N, (c)S-15N, (d)H-14N, and (e)H-15N
400 mg/mL (DMSO- d_6), 30°C, 30deg-pulse

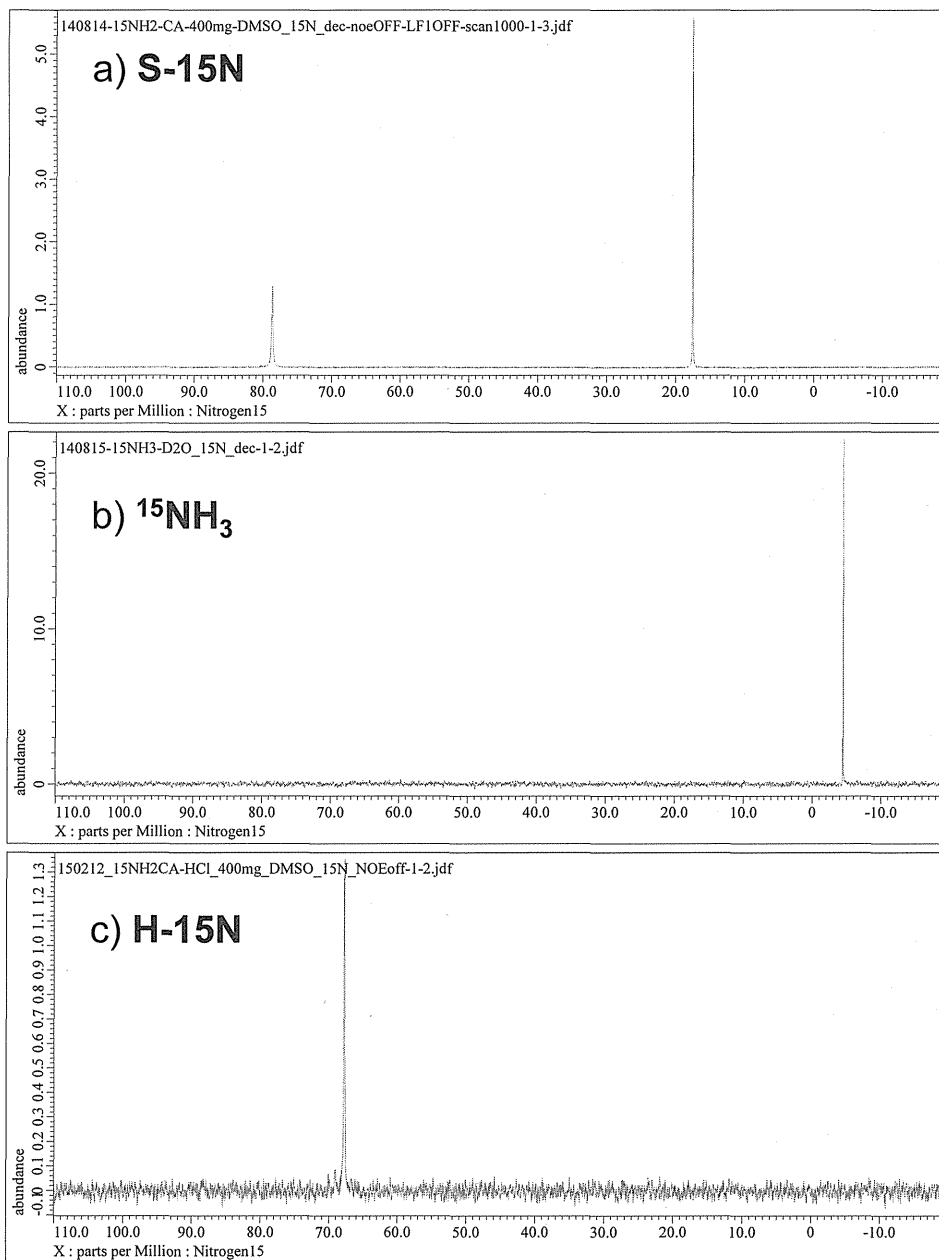
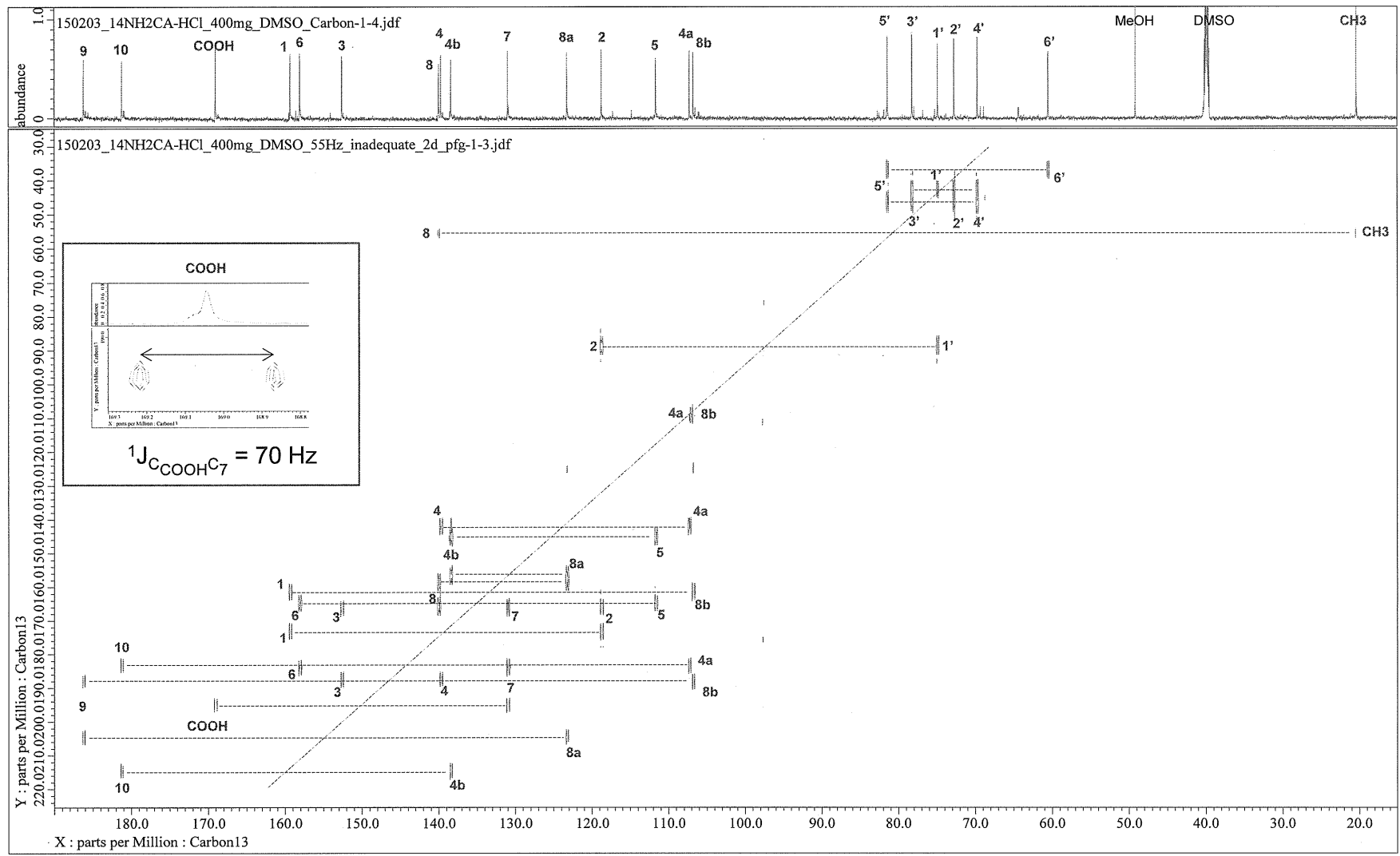


Fig. 6. The one-dimensional ^{15}N spectra of (a) acid-stable carmine (S-15N) in $\text{DMSO}-d_6$, (b) $^{15}\text{NH}_3$ in D_2O and (c) acid-stable carmine (H-15N) in $\text{DMSO}-d_6$

Fig. 7. 2D-INADEQUATE spectrum of acid-stable carmine (H-14N) 400 mg/mL DMSO-d₆, 50°C, $^1J_{cc} = 55$ Hz, scan = 400, total acquisition time 1.1 days



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）

既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究

(H26-食品-一般-001)

平成 26 年度分担研究報告書

酸化防止剤の力価評価- DPPH 法と ORAC 法の比較-

分担研究者 受田 浩之 高知大学教育研究部総合科学系 教授

研究要旨

複数試験機関での評価研究が行われプロトコールの妥当性確認が終了している DPPH 法と ORAC 法を用い、既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価を行った。その結果、両方法による評価結果の相関は、酸化防止剤に含まれる主要抗酸化成分の種類に影響を受け、大きく異なることが判明した。今後、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 DPPH 法の適用を進めて行く際、DPPH 法の適用が困難な酸化防止剤については ORAC 法を含め他の抗酸化活性測定法の適用を適宜検討する必要があると推察される。その際、酸化防止剤の主要抗酸化成分の各種抗酸化測定法への応答を考慮に入れ、適切な力価評価法を選択する必要があると考えられた。

研究協力者

島村 智子 高知大学教育研究部総合科学系 准教授

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、これまでの研究において複数機関での評価研究を経て、1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法を標準法の候補として選出した¹⁾。

一方、農産物・食品の抗酸化能評価法とし

て酸素ラジカル吸収能 (Oxygen radical absorbance capacity; ORAC) 法の共同試験が近年実施された²⁾。この共同試験結果を受けて標準作業手順書が作成され、現在、農業・食品産業技術総合研究機構を通して標準作業手順書、ならびに測定計算用テンプレートファイルの配布が行われている³⁾。

そこで本研究では、上記で配布されている ORAC 法の手順に従い酸化防止剤の力価評価を行い、DPPH 法による評価結果との比較を行った。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

分析試料として日本食品添加物協会を通じて入手したチャ抽出物 5 種類、トコフェロール類 5 種類、ローズマリー抽出物 2 種類、単糖・アミノ酸複合物、生コーヒー豆抽出物、コメヌカ酵素分解物、フェルラ酸、ヤマモモ抽出物、エンジュ抽出物、酵素処理イソクエルシトリン、ルチン、酵素処理ルチン、ルチン酵素分解物を使用した。6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) とフルオレセインは、Sigma-Aldrich 製を使用した。2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) と DPPH は和光純薬工業より購入したものをを用いた。

2. 装置

実験には以下の装置を使用した。蛍光マイクロプレートリーダー； PLATE manager V4 for Infinite 200 (TECAN 製)、マイクロプレート用インキュベーター； Inca Personal

Plate Incubator (Mikura Ltd. 製)、分光光度計； UV - VIS Spectrophotometer UV-1240 (島津製作所製)。

3. DPPH 法

3-1. DPPH 溶液調製

DPPH 7.89 mg を秤量し、99.5% エタノールに溶解後、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、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 μ L、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μ 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 μ 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、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。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

サンプリングチューブに試料溶液 200 μ 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 μ L の混合液を用いた。

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。

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

3-3. 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。回帰直線は原点を通らなくてもよいこととした。この際、全ての点がほぼ回帰直線上に位置していることを確かめた。
- (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) 上記(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。これを各試料の IC₅₀ (μ g/mL) とした。

3-4. 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) で示した。算出には以下の式を用いた。

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

4. ORAC 法

農業・食品産業技術総合研究機構より配布されている標準作業手順書、ならびに測定計算用テンプレートファイルを用いて測定を行った³⁾。

単糖・アミノ酸複合物、生コーヒー豆抽出物、コメヌカ酵素分解物、酵素処理イソクエルシトリンは 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。その他の酸化防止剤はメタノール：水：酢酸 (90 : 9.5 : 0.5) 混合溶液に溶解した。

蛍光用マイクロプレートに試料溶液 35 μ L、110.7 nM フルオレセイン溶液 115 μ L を添加した後、37°C で 10 分間のプレインキュベーションを行った。その後、蛍光強度 (励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm) を測定した。その後、31.7 mM AAPH 溶液 50 μ L を加え、2 分間隔で 90 分間蛍光強度 (励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm) を測定した。各測定前にマイクロプレートの攪拌を行った。標準物質には Trolox を用いた。試料溶液、及び Trolox 添加時の net AUC (Area Under Curve) を算出した後、20 μ M Trolox の net AUC を基準として、各試料の ORAC 値 (μ mol TE/g) を算出した。

C. 研究結果および考察

1. 各種酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性、及び ORAC 値

各酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性、

及び ORAC 値を表 1 に示した。今回測定に用いた酸化防止剤 22 種類のうち、DPPH 法では 20 種類、ORAC 法では 22 種類全てにおいて抗酸化力価を求めることができた。このことから、両方法とも比較的広い適用範囲を有することが判明した。

2. 各種酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の比較

各種酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の比較を行うために、両者の相関を調べた (図 1)。その結果、相関係数は 0.460 ($n = 20$) となった。両者の間の相関は有意であったが ($p < 0.05$)、直線性は高いものではなかった。

また、図 1 の中に示したように酸化防止剤の種類によって、DPPH 法と ORAC 法において異なる挙動を示すことが判明した。具体的には、カテキン類が主要抗酸化成分であるチャ抽出物では、DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値共に大きな変化を示し、両者の間に高い直線性が認められた ($r = 0.775$, $n = 5$)。それに対して、ケルセチン配糖体、及びその類縁化合物が主要抗酸化成分であるヤマモモ抽出物、エンジュ抽出物、ルチン類の場合、DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の間に相関は認められなかった ($r = -0.239$, $n = 7$)。このことから、主要抗酸化成分の基本構造がフラバノールであるかフラボンであるか、或いは配糖体であるか否かにより、DPPH 法、及び ORAC 法に対する挙動が異なる可能性が示唆された。

D. 結論

共に複数試験機関での評価研究が行われ、プロトコールの妥当性確認が終了している DPPH 法と ORAC 法を用い、既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価を行った。その結果、両方法による評価結果の相関は、酸化防止剤に含まれる主要抗酸化成分の種類に影響を受け、大きく異なることが判明した。今後、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 DPPH 法の適用を進めて行く際、DPPH 法の適用が困難な酸化防止剤については ORAC 法を含め他の抗酸化活性測定法の適用を適宜検討する必要があると推察される。その際、酸化防止剤の主要抗酸化成分の各種抗酸化測定法への応答を考慮に入れ、適切な力価評価法を選択する必要があると考えられた。

E. 参考文献

- 1) Tomoko Shimamura, Yoshihiro Sumikura, Takeshi Yamazaki, Atsuko Tada, Takehiro kashiwagi, Hiroya Ishikawa, Toshiro Matsui, Naoki Sugimoto, Hiroshi Akiyama, and Hiroyuki Ukeda, Applicability of DPPH Assay for Evaluation of Antioxidant capacity of food additives -Inter-laboratory evaluation study-, Analytical Sciences, 30, 717-721 (2014).
- 2) Jun Watanabe, Tomoyuki Oki, Jun Takebayashi, Koji Yamasaki, Yuko Takano-Ishikawa, Akihiro Hino, and Akemi Yasui, Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance

capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts, *Analytical Sciences*, 28, 159-165 (2012).

- 3) (独) 農業・食品産業技術総合研究機構：
<http://www.naro.affrc.go.jp/nfri/contents/haifu/index.html>

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Tomoko Shimamura, Yoshihiro Sumikura, Takeshi Yamazaki, Atsuko Tada, Takehiro Kashiwagi, Hiroya Ishikawa, Toshiro Matsui, Naoki Sugimoto, Hiroshi Akiyama, and Hiroyuki Ukeda, Applicability of DPPH Assay for Evaluation of Antioxidant Capacity of Food Additives -Inter-laboratory Evaluation Study-, *Analytical Sciences*, 30, 717-721 (2014).
- 2) Kraingkrai Ponghong, Tomoko Shimamura, Keiro Higuchi, Takehiro Kashiwagi, Kate Grudpan, Shoji Motomizu and Hiroyuki Ukeda, Spectrophotometric Sequential Injection Analysis System for Estimating the Concentration of Lipid Hydroperoxides in Edible Oils, *Journal of Flow Injection Analysis*, 31, 33-37 (2014).

2. 学会発表

- 1) Tomoko Shimamura, Kraingkrai Ponghong, Keiro Higuchi, Takehiro Kashiwagi, Kate

Grudpan, and Hiroyuki Ukeda, Development of sequential injection analysis system for evaluating lipid peroxidation inhibitory activity of antioxidants, 19th International Conference on Flow Injection Analysis, 2014/11/30-12/5, (Fukuoka).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 酸化防止剤のDPPHラジカル消去活性、及びORAC値

	DPPHラジカル消去活性 (TEAC)	ORAC値 ($\mu\text{mol TE/g}$)
チャ抽出物A	1.54	5165
チャ抽出物B	1.38	7313
チャ抽出物C	1.92	7491
チャ抽出物D	2.30	7863
チャ抽出物E	1.09	4155
トコトリエロール	0.55	31
d- α -トコフェロール	0.44	31
d- γ -トコフェロール	0.52	17
d- δ -トコフェロール	0.47	37
ミックストコフェロール	0.36	23
単糖・アミノ酸複合物	n. d	130
生コーヒー豆抽出物	0.46	423
ローズマリー抽出物A	0.33	3383
ローズマリー抽出物B	0.08	408
コメヌカ酵素分解物	n. d	313
フェルラ酸	0.73	11642
ヤマモモ抽出物	1.32	8850
エンジュ抽出物	0.97	11619
酵素処理イソクエルシトリン	0.83	10455
ルチン酵素分解物	1.03	15111
ルチン	0.81	14379
酵素処理ルチン	0.80	9549

n. d: not detected

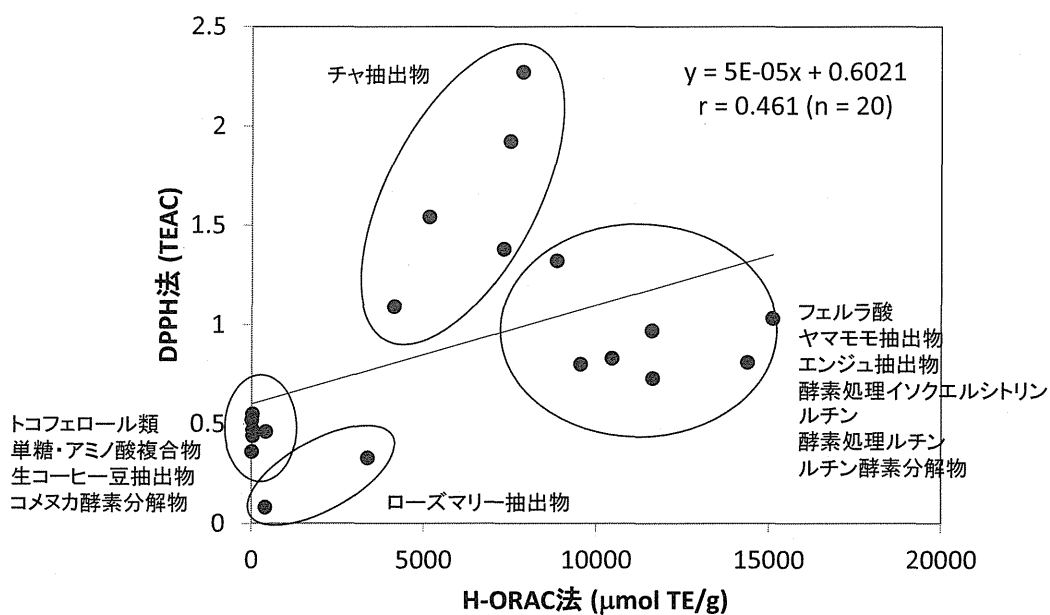


図1 各種酸化防止剤のDPPHラジカル消去活性とORAC値の比較

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26年度分担研究報告書

分担研究課題：既存添加物ムラサキイモ色素の成分規格の検討

分担研究者 井之上 浩一 静岡県立大学薬学部 講師

研究要旨

既存添加物名簿および日本食品添加物協会「既存添加物自主規格」に記載されている「ムラサキイモ色素」と「ムラサキヤマイモ色素」の品質規格作成のため、それぞれの比較検討を実施した。初めに、8版公定法を基盤に国内で流通するムラサキイモ色素の評価を行った。また、4版自主規格によるムラサキヤマイモ抽出試料の評価も行った。その結果、本評価では、ムラサキイモ色素とムラサキヤマイモ抽出試料は規格基準内であったが、お互いを区別することが不可能であった。そこで、HPLCによる吸収極大波長に基づき分離分析法を開発し、各色素成分のピークパターンを評価した。その結果、両色素では、その成分が大幅に異なり、各ピークの同定が求められた。そこで、LC-MSによる成分分析を行った結果、ムラサキイモ色素成分は、その殆どで同定することが達成できた。しかしながら、ムラサキヤマイモでは、各成分の同定までには至らなかった。本研究より、現在の規格基準では、ムラサキイモおよびムラサキヤマイモでは区別できないが、色素成分が大幅に異なり、いずれの成分を明確にし、含有物質による評価基準を行えば、両色素の判別が可能ということが分かった。

研究協力者

細谷孝博 静岡県立大学食品栄養科学部 助教

A. 研究目的

ムラサキイモ色素は、サツマイモ (*Ipomoea batatas* P.) の塊根から得られ、シアニジンアシルグルコシドおよびペオニジンアシルグルコシドを主成分とする。また、ムラサキヤマイモ色素は、ヤマノイモ科ヤマイモ (*Dioscorea alata* L.) の塊根より、水もしくは含有エタノールで抽出したものであり、ムラサキイモ色素と同じくシアニジンアシルグルコシドなどを主色素成分としている。いずれの色素も酸性溶液において、赤～暗赤紫色であり、アルカリ溶液では、暗緑色を呈する。これらの色素の確認試験は、第8版食品添加物公定書（以下、8版公定法）および日本食品添加物協会「第4版 既存添加

物自主規格」（以下、4版自主規格）に規格されている^{1,2)}。ムラサキイモ色素は、8版公定法により、(1)～(3)の確認試験がある¹⁾。また、ムラサキヤマイモ色素は、4版自主規格により、(1)～(3)の確認試験がある²⁾。その方法は、実験操作や基準など殆ど同じであり、同様の規格試験となっている。つまり、本試験において、これら2種類の色素を識別することはできない。

一方で、ムラサキイモ色素およびムラサキヤマイモ色素の主成分は、シアニジンアシルグルコシドなどと示されているが、詳細な比較検討は実施されていない。つまり、今後の規格試験では、2種類の色素を比較しながら、指標となる成分の探索や試験法の検討を実施する必要がある。そこで、本研究では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた各成分比較を実施することとした。初めに現在までに報告されている各色素の成分を比較する。

『ムラサキイモ色素 (*Ipomoea batatas* P.)』

ムラサキイモ色素は、国内で加工食品に多く利用されており、いくつかの品種も存在している。その品種により、含有するアントシアニンの種類も異なっている。Lee らは、栽培手法の異なる4種類のムラサキイモの成分をHPLCおよび液体クロマトグラフィー質量分析法

(LC-MS)により、比較検討を報告している³⁾。主な色素成分は、Cyanidin, Peonidin および Pelargonidin の配糖体と報告している。一方で、Truong らも同様に LC-MS による成分調査を行っている⁴⁾。本結果では、Malvidin, Petunidin, Delphinidin および Quercetin としている。一方、国内の研究者らは、紫甘しょの食用色素原料および塊根抽出物より、主に cyanidin および Peonidin のグルコシド類と報告している^{5,6)}。

本研究では、国内で流通されている5製品およびムラサキイモ塊根を分析対象とした。

『ムラサキヤマイモ色素 (*Dioscorea alata* L.)』

ムラサキヤマイモは、ヤマイモ科ヤマイモ属の植物で英名では、Purple yam と言われている。4版自主規格では、既存添加物として挙げられているが、現在は、厚生労働省より、「食品添加物としての流通実態が確認できない既存添加物」のリストに載っている(既存添加物名簿番号:370)。李らは、ムラサキヤマイモの成分特性として、抗酸化作用や各主成分の解析を報告している⁷⁾。また、津久井らは、フィリピンで市販されている Purple yam 粉末から、アントシアニン類の分析を実施している。その結果、主に3種類(シアニジン-3-ゲンチオビオシド+p-クマール酸(42%)、マルビジン-3-ゲンチオビオシド-5-ラムノシド+p-クマール酸(35%) およびマルビジン-3-ゲンチオビオシド-5-グルコシド+p-クマール酸(22%))と示している⁸⁾。しかしながら、詳細な成分分析に関する報告は殆どない。

本研究では、国内において、色素製剤が入手できなかったため、ムラサキヤマイモ塊根(2種類)から抽出したものを対象試料とした。

B. 研究方法

1. 試料

平成26年度内に国内入手可能な4種類のムラサキイモ色素(①株式会社パイオニア企画:アヤ紫さつま芋, ②三笠産業株式会社:ムラサキイモファインパウダー, ③藤元商店:紫芋パウダー, ④サンレッドYM粉末ムラサキイモ色素)を試料とした。また、ムラサキイモ(千葉県産)およびムラサキヤマイモ(沖縄県産および自家栽培[静岡県立大学薬草園])塊根を用いた。

2. 試薬および標準溶液

水酸化ナトリウム, エタノール, クエン酸, ギ酸, 酢酸は和光純薬社製(特級)を用いた。精製水およびアセトニトリルは、ミリポア社製を利用した。

クエン酸緩衝液(pH 3.0): クエン酸 2.1 g を量り、精製水を加えて、100 mL とする。また、リン酸2ナトリウム 7.16 g を量り、精製水を加えて、100 mL とする。両溶液を比率 159:41 で混合する。

水酸化ナトリウム溶液: 水酸化ナトリウム 1.0 g を量り、精製水 25 mL で定容した。

3. 装置

電子天秤: メトラー製 METTLER AE 100

遠心分離: クボタ製 KUBOTA 2410 および日立製作所社製 HITACHI CF16RX2

恒温振盪水槽: NTS-400A, HU-M, 東京理化学器械(株)製

紫外可視分光光度計: 日立製作所社製 U-2010

HPLC 装置: Waters 社製 Waters Acquity H Class

4. 8版公定法(ムラサキイモ色素)

(1) 対象試料の色価 50 に換算して 1.0g に相当する量を電子天秤で量り、クエン酸緩衝液(pH 3.0) 100 mL に溶解する。

(2) (1)の溶液に水酸化ナトリウム溶液を加えて、

アルカリ性とする。

(3) (1)の溶液の吸収極大波長を測定する。

5. 4版自主規格 (ムラサキヤマイモ色素)

(1) 対象試料の色価 20 に換算して 1.0g に相当する量を電子天秤で量り、クエン酸緩衝液 (pH 3.0) 100 mL に溶解する。

(2) (1)の溶液に水酸化ナトリウム溶液を加えて、アルカリ性とする。

(3) (1)の溶液の吸収極大波長を測定する。

6. 塊根からの色素成分の抽出

対象試料を水/エタノールによるミキサーで粉碎し、超音波抽出を行う。その後、遠心分離を行い、上清を 1 mL 採取し、精製水で 10 倍希釈する。本試料を固相抽出 Sep-Pak で精製したものを試料とした。

7. HPLC による分離分析

対象色素および塊根から抽出物は水/アセトニトリル混液 (50/50, V/V) により調製した。移動相には、1.0% ギ酸水溶液/アセトニトリルを使用し、0分から30分かけて組成比 90/10 から 75/25 まで、グラジュエントを行い、その後、10/90 で 5 分間送液した。

カラム: TSKgel ODS column (2.0×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)

カラム温度: 40°C

移動相: 1.0% ギ酸水溶液/1.0% ギ酸アセトニトリル (B:10% (0-1 min) →60% (40 min))

流速: 0.2 mL/min

検出波長: 210-600 nm

注入量: 5 μL

8. LC-MS による構造解析

装置には、Thermo Fisher Scientific 社製 Accela/Q-Exactive を用いた。測定条件は、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI: ポジティブ

モード) で行った。その他の条件は下記に示す。

MS 条件

Scan range: m/z 200-2000

Resolution: 70,000

Polarity: Positive

Sheath gas flow rate: 40

Aux gas flow rate: 10

Spray voltage 3.80 kV

Capillary temperature: 350°C

Heater temperature: 300°C

MS/MS 条件

Scan range: m/z 150-150

Resolution: 70,000

Polarity: Positive

Sheath gas flow rate: 40

Aux gas flow rate: 10

Spray voltage 3.80 kV

Capillary temperature: 350°C

Heater temperature: 300°C

NCE: 15 eV

C. 研究結果

1. 8版公定法および4版自主規格の評価

8版公定法および4版自主規格に従い、各検液を調製し、各試験を実施した。また、塊根からの色素成分に関しては、濃縮乾固した粉末試料を同様色素製剤として扱い、本試験に利用した。試験結果に関して、ムラサキイモ色素の8版公定法およびムラサキヤマイモ色素の4版自主規格は、いずれも確認判定が同じであるため、以下の記載は同列とする。

(1) いずれも赤～暗紫赤色の色彩を示し、色価などの判別は可能であった (Fig. 1)。

(2) いずれも暗緑色の色彩を示し、アルカリによる色彩変化の判別は可能であった (Fig. 2)。

(3) 紫外可視分光光度計により、吸光度を測定した。本結果を Fig. 3 に示す。8版公定法に従

い、ムラサキイモ色素は、515～535 nm において吸収極大波長が観察された。一方で、ムラサキヤマイモ色素では、4版自主規格の525～545 nm 付近での吸収極大波長を示した (Fig. 3)。

本結果より、国内で入手したムラサキイモ色素および塊根抽出試料は、8版公定法の規格基準に適合するものと判断できる。それに加え、ムラサキヤマイモ塊根抽出試料に関しても、4版自主規格に適合する。しかしながら、両規格試験では、ムラサキイモ色素やムラサキヤマイモ色素の判別は不可能である。そこで、HPLC による成分比較を実施した。

2. HPLC による分離分析

8版公定法 (515～535 nm) および4版自主規格 (525～545 nm) に検出波長を設定し、逆相分配モードによる成分分析を実施した。移動相の条件を検討した結果、ギ酸濃度を1.0%以上でないと良好な分離が達成できなかった。また、トリフルオロ酢酸では、0.5%でも十分に良好な分離ができた。そのような結果より、LC-MS への連結を想定して、1.0%ギ酸水溶液/アセトニトリル系を用いることにした。その際の代表的なムラサキイモおよびムラサキヤマイモのクロマトグラムを Fig. 4 に示す。ムラサキイモに関するクロマトグラムは、既報のピークパターンと類似しており、ほぼ良好な分離分析が達成できたと推定される^{3,4)}。一方で、ムラサキヤマイモでは、ムラサキイモとは全く異なるピークパターンを示した。本クロマトグラムと比較検討できる研究報告はなく、各成分の比較同定などが必要と考えられる。これらのピークはいずれも8版公定法 (515～535 nm) および4版自主規格 (525～545 nm) の確認試験を示す由来成分である。そのため、これらの比較を行うことで、今後の規格試験へ応用できるものとする。そこで、各成分のLC-MS 分析を行うこととした。

3. LC-MS による同定分析

HPLC の分離条件を利用して、LC-MS による同定分析を実施した。ムラサキイモの LC-MS

クロマトグラムを Fig. 5 に示す。検出波長 513～535 nm による主な検出は、14 ピーク観察され、いずれも ESI-Positive モード (m/z 200～2000) でマススペクトルを得ることができた。また、いずれも既報^{3,4)}とのピークパターン、質量数 (理論値)、フラグメントイオンより、同定することが可能であった。ピーク 1 は、 $[M+H]^+$ m/z 773.212 (理論値: m/z 773.2135, $C_{33}H_{41}O_{21}$) となり、MS/MS では、 m/z 611, 499, 287 が検出され、cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 6)。ピーク 2 は、 $[M+H]^+$ m/z 787.229 (理論値: m/z 787.2291, $C_{34}H_{43}O_{21}$) となり、MS/MS では、 m/z 625, 436, 301 が検出され、peonidin 3-sophoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 7)。ピーク 3 は、 $[M+H]^+$ m/z 893.234 (理論値: m/z 893.2346, $C_{40}H_{45}O_{23}$) となり、MS/MS では、 m/z 731, 449, 287 が検出され、cyanidin 3-p-hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 8)。ピーク 4 は、 $[M+H]^+$ m/z 935.244 (理論値: m/z 935.2452, $C_{42}H_{47}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 773, 449, 287 が検出され、cyanidin 3-(6"-caffeoylsophoroside)-5-glucoside と同定できた (Fig. 9)。ピーク 5 は、 $[M+H]^+$ m/z 907.249 (理論値: m/z 907.2503, $C_{41}H_{47}O_{23}$) となり、MS/MS では、 m/z 745, 463, 301 が検出され、peonidin 3-p-hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 10)。ピーク 6 は、 $[M+H]^+$ m/z 949.260 (理論値: m/z 949.2608, $C_{43}H_{49}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 787, 463, 301 が検出され、peonidin 3-(6"-caffeoylsophoroside)-5-glucoside と同定できた (Fig. 11)。ピーク 7 は、 $[M+H]^+$ m/z 949.260 (理論値: m/z 949.2608, $C_{43}H_{49}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 787, 449, 287 が検出され、cyanidin 3-feruloylsophoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 12)。ピーク 8 は、 $[M+H]^+$ m/z 963.275 (理論値: m/z 963.2765, $C_{44}H_{51}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 801, 463, 301 が検出され、peonidin 3-ferulyolsophoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 13)。ピーク 9 は、 $[M+H]^+$ m/z 933.264