

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28年度研究分担報告書

研究分担課題：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 教授

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基準値の設定を目的とし、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法による一般試験法案を作成した。本研究では、作成した一般試験法案に基づき、実際にトロロックス、及び酸化防止剤19種類の抗酸化力価評価を行い、適用性、及び再現性の確認を行った。その結果、試験に用いた酸化防止剤19種類全てについて抗酸化力価の指標であるトロロックス等価活性 (TEAC) を求めることが可能であったことから、一般試験法案の適用性については問題ないと判断した。また、トロロックスの IC₅₀、及び酸化防止剤のTEACを求めた際の変動係数は概ね5.0%以下であり、一般試験法案の手順に従うことにより、再現性の高い抗酸化力価評価が可能であることが判明した。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部第二室 室長
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

既存添加物は 1995 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主に天然由来の添加物である。既存添加物については規格基準設定を目的として、成分組成の分析、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、酸化防止用途の一部の既存添加物は多種類の成分が抗酸化力価に関与しており、すべての抗酸化物質の分析・同定を行うことが困難である。このような既存添加物では、成分組成に基づく規格が設定できないことから、品質確保のためには主要な成分組成と抗酸化力価の確認の組み合わせにより、規格設定することが望まれている。そのため、抗酸化力価の標準法の確立が必要と考えられる。このような状況のもと、これまでに各種抗酸化活性測定法の既存添加物の抗酸化力価評価への適用性を検討し、1,1-diphenyl-2-

picrylhydrazyl (DPPH) 法に関する複数機関での評価研究を行い、最終的に DPPH 法を標準法の候補として選出し、DPPH 法に基づく一般試験法案を作成した。

今年度は作成した一般試験法案に基づき、実際にトロロックス、及び酸化防止剤 19 種類の抗酸化力価評価を行い、適用性、及び再現性の確認を行った。

B. 一般試験法案

抗酸化活性測定法は、酸化防止剤の抗酸化活性を測定する方法である。DPPH ラジカル消去率を求め、(±)-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (トロロックス) 等価活性 (TEAC) で表す。

1. 操作法

(1) トロロックスの DPPH ラジカル消去率の測定

トロロックス 100 mg を精密に量りとり、エタノール (99.5) を加えて 100 mL とする。この液 50 mL を正確に量りとり、エタノール (99.5) を加え 500 mL とし、トロロックス標準原液とする。標準原液をエタノール (99.5) を加えて希釈

し, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL のトロロックス標準液を調製する¹. 試験管にトロロックス標準液 200 µL を量りとり, 抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加えて混合する. この液に DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 1000 µL を加え, 直ちに 10 秒間攪拌後, 室温暗所で 30 分間静置し, 検液とする. 別に標準液の代わりにエタノール (99.5) を用いて検液の調製と同様に操作し, 比較液とする. エタノール (99.5) 1200 µL に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加え, 混合したものを対照液とし, 波長 517 nm における検液の吸光度 A_R 及び比較液 A_C を測定し, 次式により DPPH ラジカルの消去率 (%) を求める.

$$\text{トロロックスの DPPH の消去率 (\%)} = \frac{(A_C - A_R)}{A_C} \times 100$$

¹ トロロックス試薬の純度は 97% であるため, 実際の試験に用いるトロロックス標準液の濃度については純度を考慮した補正を行う.

(2) トロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) の算出

横軸に消去率 50% を挟む 2 点のトロロックス標準液の濃度 (40 µg/mL と 60 µg/mL, あるいは 60 µg/mL と 80 µg/mL), 縦軸に DPPH の消去率 (%) をとり, グラフにそれぞれの値をプロットする². この 2 点を通る回帰線から, トロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求める. ただし, 3 回の繰り返し測定を行い, その平均値をトロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) とする.

² 2 点の間に消去率 50% があることを確認する. いずれの濃度でも消去率 50% を挟まない場合は標準液の調製からやり直す.

(3) 試料の DPPH ラジカル消去率の測定

別に規定する量の試料を試験管に量りとり, 別に規定する量の希釈溶媒を加えて希釈し, 5 種以上の異なる濃度の試料液を調製する. 試験管に試料液 200 µL を量りとり, 抗酸化活性測

定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加えて混合する. この液に DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 1000 µL を加え, 直ちに 10 秒間攪拌後, 室温暗所で 30 分間静置し, 検液とする. 別に試験液の代わりに希釈溶媒を用いて検液の調製と同様に操作し, 比較液とする. エタノール (99.5) 1200 µL に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加え, 混合したものを対照液とし, 波長 517 nm における検液の吸光度 A_S 及び比較液 A_C を測定し, 次式により DPPH ラジカルの消去率 (%) を求める.

$$\text{DPPH の消去率 (\%)} = \frac{(A_C - A_S)}{A_C} \times 100$$

(4) 酸化防止剤試料の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) の算出

横軸に酸化防止剤試料液の濃度, 縦軸に DPPH の消去率 (%) をとり, グラフにそれぞれの値をプロットする. DPPH の消去率 50% を挟む酸化防止剤試料液の濃度 2 点を通る回帰線から, トロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求める. ただし, 3 回の繰り返し測定を行い, その平均値をトロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) とする.

(5) トロロックス等価活性 (TEAC) の算出

酸化防止剤試料液とのトロロックス標準液の IC_{50} が同一の活性を有しているとみなし, 酸化防止剤の抗酸化活性をトロロックス等価活性 (TEAC) で表す. 酸化防止剤のトロロックス等価活性は次式により求める.

$$\text{酸化防止剤のトロロックス等価活性 (TEAC: } \mu\text{g}/\mu\text{g)}^3 = \text{トロロックスの } IC_{50} (\mu\text{g/mL}) / \text{酸化防止剤試料液の } IC_{50} (\mu\text{g/mL})$$

³ 同一日に測定した酸化防止剤試験溶液の IC_{50} とトロロックスの IC_{50} の値を用いて TEAC を求めることが望ましい.

2. 試薬, 試液, 標準品

(1) トロロックス標準溶液

(±)-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチル

クロマン-2-カルボン酸, Aldrich 製, 233813, 純度 97%

(2) トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4), 抗酸化活性測定法用

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール⁴ 12.1 g を量り, 水を加えて溶かし, 塩酸試液 (1 mol/L) で pH 7.4 に調整し, 水を加えて 1000 mL とする.

⁴ 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール, 和光純薬工業 特級, 207-06275, 純度 99.0%

(3) DPPH 試液 (0.2 mmol/L)

DPPH⁵ 17 mg を精密に量りとり, エタノール (99.5) を加えて溶かし, 200 mL とし, 遮光して吸光度が定常状態に達するまで 2 時間放置する.⁶ この液 1000 μ L を試験管に正確に量りとり, エタノール (99.5) 200 μ L と抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 μ L を正確に加えて混合し検液とする. エタノール (99.5) 1200 μ L に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 μ L を加え, 混合したものを対照液とする. 検液につき 517 nm における吸光度を測定し, 検液の吸光度が 1.00 ± 0.05 の範囲内であることを確認する. 検液の吸光度が 1.05 を超える場合はエタノール (99.5) を加えて希釈し, 検液の吸光度が 1.00 ± 0.05 の範囲内に入るように調整する. 用事調製とする.

⁵ DPPH, Aldrich 製, D9132

⁶ DPPH 溶液は, 調製直後から 1 時間程度まで時間と共に吸光度が低下する. 2 時間放置することで吸光度が定常状態に達する.

C. 研究結果と考察

(1) トロロックスの IC₅₀

酸化防止剤の抗酸化力価評価においてトロロックスの IC₅₀ は TEAC 算出の基礎となる重要

な値である. そこで, 一般試験法案に基づき, トロロックスの IC₅₀ の算出に関する手順について繰り返し試験 (n = 8) を実施し, その再現性を調べた. その結果, トロロックスの IC₅₀ の平均は $59.3 \pm 0.77 \mu\text{g/mL}$ であり, 変動係数は 1.30% となった. この結果より, 一般試験法案によるトロロックスの IC₅₀ の算出に関しての再現性は問題ないと判断した.

(2) 酸化防止剤チャ抽出物の力価評価

酸化防止剤 19 種類 (サンフェノン EGCg, サンフェノン 90S, サンフェノン BG-3, カメリアエキス 30S, チャ抽出物, 茶抽出物 40, 茶抽出物 70, ポリフェノン PF, ポリフェノン 70S, ポリフェノン G, サンフード 100, テアピゴ, カメリア 50EX, d- δ -トコフェロール, 生コーヒー豆抽出物, ローズマリー抽出物, ヤマモモ抽出物, 酵素処理イソクエルシトリン, 酵素処理ルチン) を試料とし, 上記の一般試験法案の手順に従い測定を行った. いずれの試料もエタノール (99.5) に溶解し, 希釈もエタノール (99.5) で行った. 各酸化防止剤の IC₅₀ 濃度, TEAC, TEAC の標準偏差 (SD), TEAC の変動係数 (CV) を表 1 に示した.

測定の結果, 19 種類の酸化防止剤全てについて IC₅₀ と TEAC を求めることが可能であった. このことから, 一般試験法案の酸化防止剤への適用性は問題ないと判断した. また, TEAC の変動係数は 0.28 ~ 7.1% となった. 特に, サンフェノン EGCg を除く 18 試料ではその変動係数が 4.3% 以下となり非常に高い再現性を示した.

E. 結論

本試験の結果より, DPPH 法に基づく一般試験法案が酸化防止剤の力価評価において広い適用性と高い再現性を示すことが明らかとなった. 今後は, 各種酸化防止剤に関する個別の手順の作成を目指す.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tadaharu Ueda, Takashi Okumura, Yukino Tanaka, Tomoko Shimamura, Hiroyuki Ukedo,

Development of a new electrochemical evaluation method for antioxidant activity based on the redox properties of polyoxometalates and its application to the evaluation of antioxidant capacity of beverages, *Analytical Sciences*, **32**, 825-830 (2016).

2) 山内良子,石井佐弥,草場悠里,小林弘司,島村智子,受田浩之,穠山浩,石川洋哉,酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH ラジカル消去能測定におよぼす反応溶媒の影響,日本食品保蔵科学会誌,**42**,189-196 (2016).

3) Enkhtsetseg Enkhtuya, Tomoko Shimamura, Takehiro Kashiwagi, Hiroyuki Ukeda, Antioxidative Constituents in the Leaves of *Paeonia anomala* Grown in Mongolia, *Food Science and Technology Research*, **23**, 63-70 (2017).

4) 島村智子,伊藤裕才,久保勇人,柏木丈拵,石川洋哉,松井利郎,山崎壮,多田敦子,杉本直樹,穠山浩,受田浩之,既存添加物チャ抽出物中の

カテキン類含量と抗酸化力価の関係,日本食品化学会会誌,印刷中.

2. 学会発表

1) 島村智子,伊藤裕才,久保勇人,柏木丈拵,石川洋哉,松井利郎,山崎壮,多田敦子,杉本直樹,穠山浩,受田浩之,既存添加物チャ抽出物の成分含量と抗酸化力価の関係,日本食品化学学会 第22回総会・学術大会,2016年6月2-3日(高知).

2) 草場悠里,山内良子,小林弘司,島村智子,受田浩之,杉本直樹,穠山浩,石川洋哉,既存添加物チャ抽出物の各種抗酸化能評価,第53回化学関連支部合同九州大会,2016年7月2日(福岡).

G. 知的財産権の出願,登録状況
なし

H. 健康危機情報
なし

表 1 一般試験法案に基づく酸化防止剤の抗酸化力価評価 (n=3)

製品名	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TEAC ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)	TEAC SD	TEAC CV(%)
サンフェノンEGC g	26.5	2.21	0.16	7.1
サンフェノン90S	28.6	2.05	0.03	1.6
サンフェノンBG-3	24.3	2.51	0.14	5.6
カメラアエキス30S	62.3	0.94	0.04	4.3
チャ抽出物	29.3	2.03	0.04	2.2
茶抽出物 - 40	55.9	1.06	0.01	1.0
茶抽出物 - 70	33.9	1.73	0.07	4.0
ポリフェノンPF	127	0.47	0.01	2.6
ポリフェノン70S	24.5	2.39	0.08	3.3
ポリフェノンG	64.5	0.91	0.02	1.7
サンフード100	49.9	1.18	0.003	0.28
テアピゴ	22.0	2.68	0.02	0.87
カメラア50EX	88.6	0.67	0.01	1.8
d- -トコフェノール	113	0.53	0.01	2.0
生コーヒー豆抽出物	180	0.33	0.01	3.6
ローズマリー抽出物	175	0.34	0.006	1.7
ヤマモモ抽出物	50.4	1.18	0.04	3.2
酵素処理イソクエルシトリン	89.2	0.67	0.006	0.92
酵素処理ルチン	85.6	0.69	0.02	2.5