

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26～28年度分担総合研究報告書

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 これまでの研究において、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た。本研究期間においては、DPPH 法と酸素ラジカル吸収能 (Oxygen radical absorbance capacity: ORAC) 法との比較を行うとともに、DPPH 法に基づく一般試験法案を作成し、その適用性、ならびに再現性に関する確認を行った。試験の結果より、酸化防止剤中の主要抗酸化成分の基本構造により DPPH 法と ORAC 法に対する応答が異なることが判明した。また、DPPH 法に基づく一般試験法案のトロロックス、及び酸化防止剤への適用性、ならびに再現性に問題がないことを確認した。

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た。H26～28 年度においては、DPPH 法と酸素ラジカル吸収能 (Oxygen radical absorbance capacity: ORAC) 法との比較を行うとともに、DPPH 法に基づく一般試験法案を作成し、その適用性、ならびに再現性に関する確認を行った。

B. 研究方法

1. DPPH 法一般試験法案

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。

1-1. 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。

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

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。

1-2. 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 μL を試験管に正確に量りとり, エタノール (99.5) 200 μL と抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 μL を正確に加えて混合し検液とする. 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.

2. 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.

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 μL, 110.7 nM フルオレセイン溶液 115 μL 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 μL 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. 標準物質にはトロロックスを用いた. 試料溶液, 及びトロロックス添加時の net AUC (Area Under Curve) を算出した後, 20 μM トロロックスの net AUC を基準として, 各試料の ORAC 値 (μmol TE/g) を算出した.

C. 研究結果と考察

1. 酸化防止剤の力価評価における DPPH 法と ORAC 法の比較

ORAC 法は農産物・食品の抗酸化評価法として共同試験が近年実施され, この共同試験結果を受けて標準作業手順書が作成された. そこで, 酸化防止剤の力価評価を ORAC 法, ならびに同じく複数試験機関による共同試験にてプロトコールの評価を行った DPPH 法とで行い, その結果について比較した.

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, ルチン酵素分解物の計 22 種類の酸化防止剤について測定を行ったところ, DPPH 法では 20 種類, ORAC 法では 22 種類の抗酸化力価

を求めることが可能であった。

また, DPPH 法と ORAC 法の測定結果の相関を調べたところ, 両者の間の相関係数は 0.460 ($n = 20$) となった。相関関係は有意であったが ($p < 0.05$), 直線性は高いものではなかった。同時に, 酸化防止剤に含まれる主要抗酸化成分の種類により DPPH 法, 及び ORAC 法に対する挙動が大きく異なることが判明した。具体的には, カテキン類を主要抗酸化成分とするチャ抽出物では DPPH 法と ORAC 法の測定結果の間に高い直線性が認められたのに対し ($r = 0.775, n = 5$), 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 法と ORAC 法の測定結果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, フラボン, あるいはその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ことが判明した。

今後, DPPH 法の適用が困難な酸化防止剤の力価評価標準法を適宜検討する場合は, 主要抗酸化成分の各種抗酸化活性測定法への応答の特徴を考慮する必要があると考えられた。

2. DPPH 法に基づく一般試験法案の適用性と再現性の検討

トロロックス, 及び酸化防止剤 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) を分析試料として用い, 一般試験法案の適用性と再現性を確認した。いずれの酸化防止剤もエタノール (99.5) に溶解し, 希釈もエタノール (99.5) で行った。

酸化防止剤の抗酸化力価評価においてトロロックスの IC_{50} は TEAC 算出の基礎となる重要な値である。そこで, 作成した一般試験法案に基づき, トロロックスの IC_{50} 算出に関する手順

について繰り返し試験を実施した ($n = 8$)。その結果, IC_{50} 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。このことから, 一般試験法案に基づくトロロックスの IC_{50} の算出に関する再現性は問題ないと判断した。

続いて, 酸化防止剤 19 種類の抗酸化力価評価を行った。その結果, 測定に用いたすべての酸化防止剤の TEAC を求めることが可能であり, その変動係数 ($n = 3$) は 0.28~7.1% となった。特に, サンフェノン EGCg を除く 18 試料の変動係数は 4.3% 以下の範囲内となり高い再現性を示すことが判明した。

D. 結論

H26~28 年度の試験結果より, 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 法に基づく一般試験法案を作成し, その適用性, 及び再現性に問題ないことが確認できた。

E. 研究発表

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, 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).

3) Tadaharu Ueda, Takashi Okumura, Yukino Tanaka, Tomoko Shimamura, Hiroyuki Ukeda, 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).

4) 山内良子, 石井佐弥, 草場悠里, 小林弘司, 島村智子, 受田浩之, 穰山浩, 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).

5) 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).

6) 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, 穰山浩, 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, *日本食品化学会誌*, 印刷中.

2. 学会発表

1) 山内良子, 高野裕子, 小浜友紀子, 加治屋明子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穰山浩, 松井利郎, 石川洋哉, 酸化防止剤評価における各種抗酸化測定法の特長, 第 51 回化学関連支部合同九州大会, 2014 年 6 月 28 日 (福岡).

2) 山内良子, 小浜友紀子, 加治屋明子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穰山浩, 松井利郎, 石川洋哉, 抗酸化能評価における一電子転移反応と水素原子転移反応の比較, *日本食品科学工学会* 第 61 回大会, 2014 年 8 月 28-30 日 (福岡)

3) 田中由季乃, 上田忠治, 島村智子, 受田浩之, ポリオキソメタレート錯体固定化電極の酸化還元特性, *日本分析化学会* 第 63 年会, 2014 年 9 月 17-19 日 (広島)

4) 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)

5) 島村智子, 吉田鉄平, 柏木丈拵, 受田浩之, 多田敦子, 杉本直樹, 穰山浩, ロダン鉄法による酸化防止剤の抗酸化力価評価, 第 27 回ビタミン研究会, 2016 年 1 月 (香川)

6) 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, 穰山浩, 受田浩之, 既存添加物チャ抽出物中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).

7) 草場悠里, 山内良子, 小林弘司, 島村智子, 受田浩之, 杉本直樹, 穰山浩, 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)

F. 知的財産権の出願, 登録状況
なし

G. 健康危機情報
なし