

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格に関する研究

～DPPH法を用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価～

研究分担者 井之上浩一 立命館大学薬学部 臨床分析化学研究室 教授

研究要旨 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH)法は抗酸化能の評価法として、一般試験法の規格化が期待されている。本手法は、96 ウェルを用いた吸光度測定（検出波長：517 nm）によりトロロックス（基準物質）と相対的に抗酸化能を評価する（トロロックス等価活性値，TEAC）ため、簡便かつ迅速な試験法が可能となる。しかしながら、規格化に向けた妥当性評価が十分に検討されていないため、本年度では抗酸化能測定キットの内容に基づいて、実験手技や実験環境を軸に DPPH 法の再現性や汎用性を評価することとした。没食子酸（酸化防止剤）を用いて試薬や調製溶媒を変更して DPPH 法を実施した結果、いずれもバラつきの少なく TEAC を得ることができた。しかしながら、様々な既存添加物に応用した際、低極性の化合物に関して試験溶液が白濁し、正常に DPPH 法を実施することが困難であった。それゆえに、使用溶媒による溶解性を検討し、既存添加物への適応性を拡大することが求められる。さらに、マニュアルの簡易化や明確さにもさらに改良することにより、その汎用性も増すと考えられる。

研究協力者

高橋未来 立命館大学薬学部 助教

A. 研究目的

既存添加物の規格基準について、これまで有効成分や構成成分の同定、各成分の分析法の開発をすることにより、成分規格試験を設定してきた¹⁾。しかしながら、酸化防止剤として使用されている既存添加物では、様々な成分が抗酸化能に関与しているため、既存添加物中の全ての抗酸化物質を同定及び分析法を開発することは困難である。それゆえに、抗酸化能を持つ既存添加物に関して、主成分などの成分解析だけでなく、酸化防止剤としての抗酸化能の一般試験法化の設定が求められている。そこで、本年度では、高い再現性かつ汎用性のある抗酸化能測定法として、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH) 法の基礎検討を試みた。

DPPH は紫色の安定なラジカル化合物であり、抗酸化物質により還元されることにより無色

に変化する（図 1）。そのため、DPPH 法はラジカルの消去活性を利用した簡便な抗酸化能の評価法として様々な分野で用いられている。さらに、DPPH 法は吸光度測定（検出波長：517 nm）により実施されるため、マイクロプレートを用いた簡便かつ迅速な多検体の測定も可能である。しかしながら、DPPH 法による抗酸化能は 50% 阻害濃度 (IC₅₀) により評価されるが、その値の再現性の乏しさが課題として挙げられていた。そこで、既報において、トロロックスを基準物質として補正したトロロックス等価活性値 (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC) による DPPH 法が報告されている²⁾。さらに、DPPH 法による TEAC 評価法はキット化（抗酸化能測定キット）されており、異なる試験機関における測定誤差がさらに少なくなると期待されている。そこで、本研究では、抗酸化能測定キットの手順や同封されている試薬類を用いて様々な既存添加物に応用することにより、その抗酸化能の再現性や適応性を評価す

ることとした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

抗酸化能測定キット (DPPH Antioxidant Assay Kit) は同仁化学社製を用い、DPPH 試薬、トロロックス標準品及びアッセイバッファーがキットに同封されていたものを用いた。チャ抽出物、ターメリック色素、赤キャベツ色素、クチナシ黄色素、ベニバナ赤色素及びマリーゴールド色素は三栄源エフ・エフ・アイ社製を用いた。DPPH は Cayman Chemical 社製を用いた。没食子酸水物、トロロックス標準品、エタノール (特級)、メタノール (HPLC 用)、アセトニトリル (HPLC 用) 及びアセトン (特級) は富士フィルム和光純薬社製を用いた。ジメチルスルホキシド (DMSO) はナカライテスク社製を用いた。また、超純水は PURELAB flex 5 system (ELGA 社製) で精製したものを使用した。0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) は、株式会社ニッポン・ジーン製 1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) を用いて調製した。

B-2) 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52
遠心分離機：日立工機社製 Himac CF15RN
吸光度計：コロナ電気株式会社製コロナマルチグレーティングマイクロプレートリーダー SH9000Lab

B-2) DPPH ラジカル消去活性試験法

試料が溶解可能である溶媒にてストック溶液を調製し、攪拌及び遠心分離 (3,000 rpm, 5分) した後、上清を測定試料として用いた。また、トロロックス溶液及び DPPH 溶液は、エタノールで溶解及び希釈することにより調製した。そして、96 穴マイクロプレートに既存添加物又は 80, 60, 40, 0 $\mu\text{g/mL}$ の各濃度に希釈したトロロックス溶液 20 μL , 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) 80 μL , 0.2 mM DPPH 溶液 100 μL を加え、暗室でインキュベート (25 $^{\circ}\text{C}$, 30 分間) した。本溶

液を吸光度計 (コロナ電気株式会社製コロナマルチグレーティングマイクロプレートリーダー SH9000Lab) により 517 nm の吸光度を測定した。さらに、ラジカル消去率を以下の式で求めた。

$$\text{ラジカル消去率 (\%)} = (A_{CS} - A_S) / A_{CS} \times 100$$

A_{CS}: 試料ブランク吸光度

A_S: 試料吸光度

B-3) TEAC 算出

試料及びトロロックス溶液をエタノールで希釈し、検量線を作成した。また、50%のラジカル消去率を含む範囲で、回帰直線を引き、算出された直線式より、IC₅₀となる濃度を求めた。3回の操作により、TEAC の平均値及び標準偏差 (S.D.) を算出した。

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

C. 結果及び考察

まず、抗酸化能測定キット試薬と自ら調製した試薬の両方を用いて、酸化防止剤である没食子酸の TEAC を確認した (表 1)。その結果、全て調製した試薬を用いた場合においてもキット試薬と同等な抗酸化能を測定できる (RSD 3.3%以下) ことを確認した。以上より、それ以降の DPPH 法の検討に関して調製した試薬を用いることとした。

次に、7種類の既存添加物を用いて、DPPH 法による抗酸化能を評価した。これら試料を没食子酸と同様に、DPPH ラジカル消去活性試験法を実施し、TEAC を算出した結果を表 2 にまとめた。その結果、没食子酸及びチャ抽出物の TEAC はそれぞれ 3.70 及び 2.78 であったが、ターメリック色素及び赤キャベツ色素の TEAC は 0.016 及び 0.013 であり、ほとんど抗酸化能が確認されなかった。さらに、マリーゴールド色素、クチナシ黄色素及びベニバナ赤色素では、ウェル内の試験溶液が白濁し、正常に吸光度を測定することができなかった。これら既存添加物が

DPPH 法の測定が困難であった要因は、使用する溶媒への溶解性が低かったためであると考えられる。マリーゴールド色素、クチナシ黄色素及びベニバナ赤色素の溶解試験を実施した際、エタノール、メタノール、アセトン、アセトニトリル及び水に溶解せず、いずれも DMSO のみ溶解可能であった (図 2)。そのため、既存添加物の試料溶液をウェルに入れ、他の試薬を添加した後、白濁してしまい、 IC_{50} が算出できなかった。このように、抗酸化能測定キットの手順では、実試料の希釈溶媒がエタノールであったため、没食子酸を用いて他の溶媒における TEAC と比較した。比較溶媒は、水、エタノール、メタノール及び DMSO を用いた。各溶媒における TEAC を図 3 に示した。その結果、没食子酸では、いずれの溶媒を用いて希釈しても TEAC の結果に影響しない (RSD; 6.5%) が、極性の低い化合物の場合は溶解性が影響することが判明した。そのため、DPPH 法は極性が高いもしくは中程度の化合物に適応可能であると考えられる。

次に、実験者間における DPPH 法の測定結果の誤差を評価した。本研究では、DPPH 法の一般試験法としての標準化を検討しているため、実験室環境下における複数の実験者による DPPH 法の再現性を調査した。3 名の実験者 (実験者 A~C) に対して、キットに同封している手順書を確認し、没食子酸の DPPH ラジカル消去活性試験法を実施し、TEAC を算出した。次いで、実験者 A~C に、手順内容を図示化したプロトコール (図 4) を確認してもらい、同様に没食子酸の DPPH 法を実施した (図 5)。その結果、実験者 A 及び B において、1 回目及び 2 回目の TEAC はほとんど同じであった。それらに対して、実験者 C は、1 回目では他の実験者と TEAC が大きく異なっていたが、2 回目の TEAC は殆ど同等の値が得られた。2 回目における全実験者による TEAC の RSD は 10% 以下であり、良好な再現性がみられた。これらの結

果より、実験環境下における高い再現性を得るために、簡易かつ明確なマニュアルの工夫化が必要であると考えられる。

D. 結論

本研究では、既存添加物における酸化防止剤の抗酸化能評価法として DPPH 法の適応を目指して、再現性や汎用性など基礎検討した。その結果、極性の高い又は中程度の化合物であれば、適応可能であり、その再現性も高かった。更なる適応拡大のために、使用溶媒による溶解性の検討が必要であると考えられる。さらに、異なる実験者における再現性の比較した結果、簡潔なマニュアルの作成をすることにより、実験者間の誤差を軽減することが可能であった。

E. 参考文献

- 1) 第 9 版食品添加物公定書, 厚生労働省(2017).
- 2) Shimamura T, Sumikura Y, Yamazaki T, Tada A, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H, Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives - inter-laboratory evaluation study. *Anal. Sci.* 30, 717-721 (2014).

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
2-1. 論文
なし
2-2. 総説
なし
2-3. 単行本
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

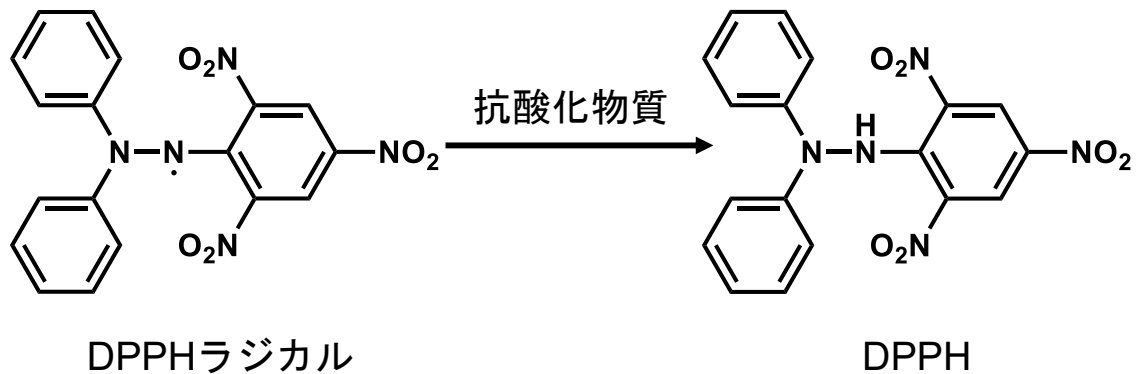


図 1. DPPH 法の反応式

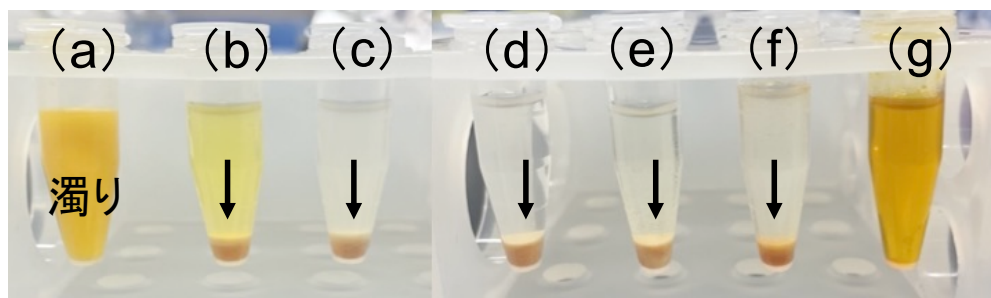
表 1. 抗酸化能測定キットの各試薬を調製した場合の TEAC (n=3)

	試薬類			TEAC±S.D.
	トロロックス溶液	DPPH溶液	0.1M Tris-HCl緩衝液	
①	キット	キット	キット	3.42 ± 0.04
②	調製した試料	キット	キット	3.73 ± 0.05
③	キット	調製した試料	キット	3.63 ± 0.18
④	キット	キット	調製した試料	3.56 ± 0.09
⑤	調製した試料	調製した試料	調製した試料	3.67 ± 0.21

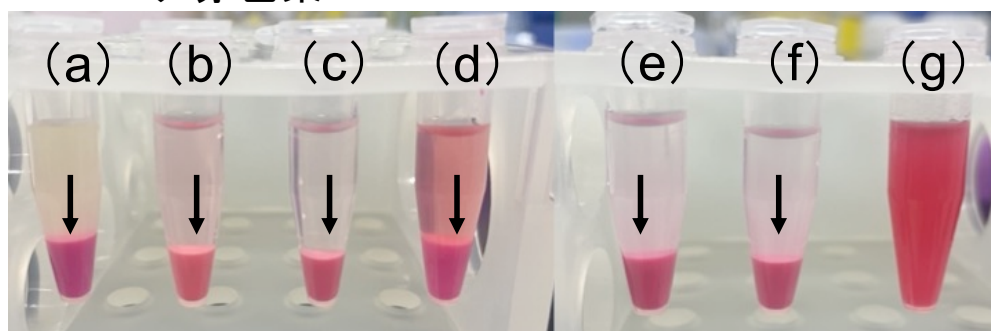
表 2. DPPH 法を用いた各既存添加物の TEAC (n=3)

試料	IC ₅₀ (μg/mL)	TEAC
没食子酸	18.6	3.70
チャ抽出物	24.8	2.78
ターメリック色素	4138	0.016
赤キャベツ色素	4903	0.013
マリーゴールド色素	-	-
クチナシ黄色素	-	-
ベニバナ赤色素	-	-

マリーゴールド色素



ベニバナ赤色素



クチナシ黄色素

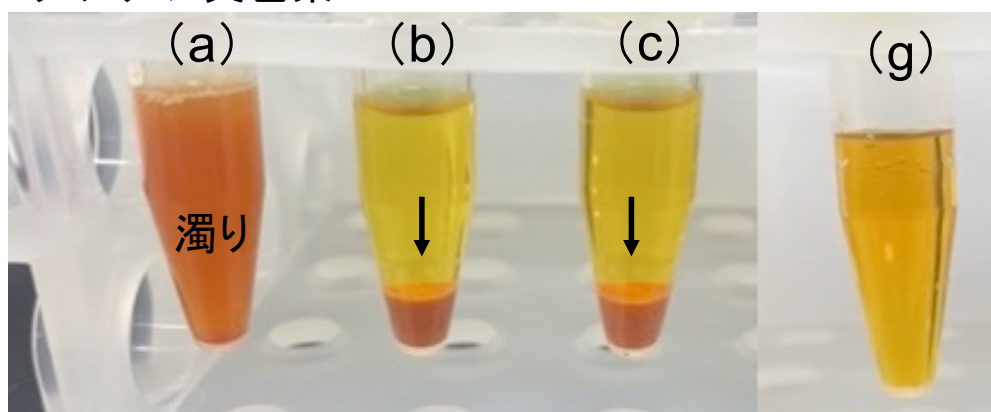


図 2. マリーゴールド色素, ベニバナ赤色素及びクチナシ黄色素の溶解試験
(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d) ジクロロメタン, (e) アセトン,
(f) アセトニトリル, (g) DMSO

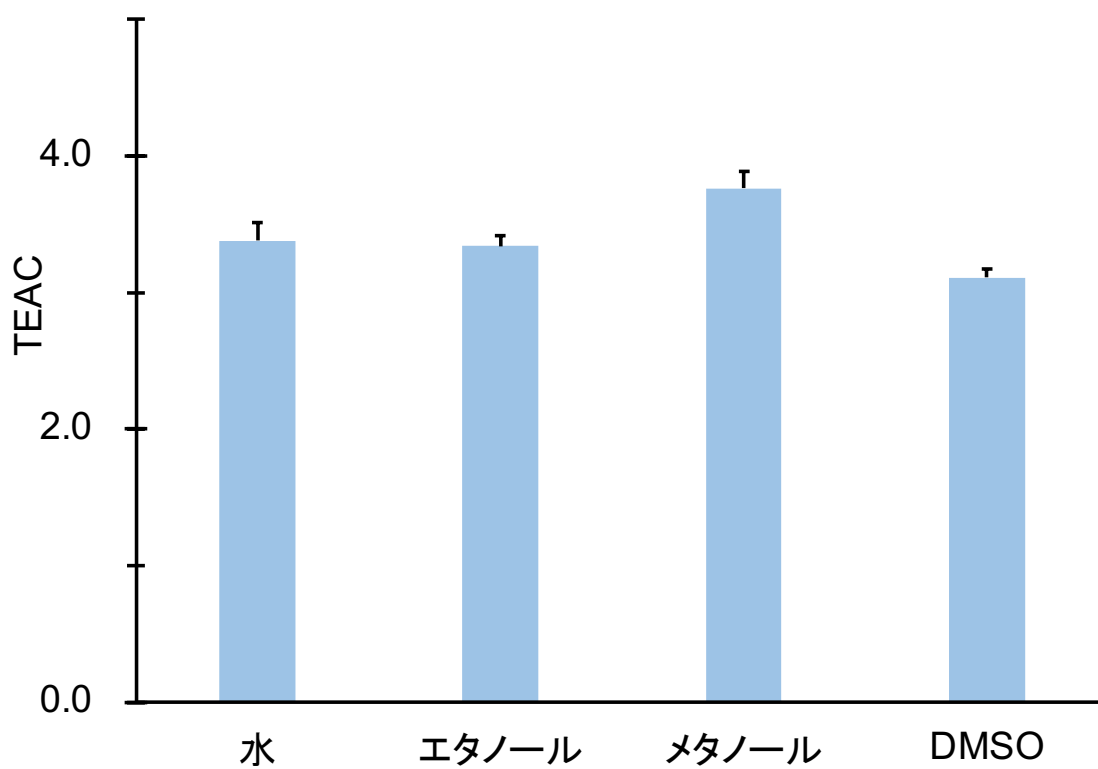


図 3. 各溶媒を用いて溶解及び希釈した際の没食子酸の TEAC (n=3)

DPPH

DPPH 4 mmol/L 500 μ L



← エタノール 9.5 mL

DPPH 0.2 mmol/L 10 mL

Trolox

Trolox 1000 μ g/mL 100 μ L



← エタノール 900 mL

Trolox 100 μ g/mL 1000 μ L



Trolox 100 μ g/mL 400 μ L 300 μ L 200 μ L 0 μ L

エタノール 100 μ L 200 μ L 300 μ L 100 μ L

80 μ g/mL

60 μ g/mL

40 μ g/mL

0 μ g/mL

図 4. 実験者が DPPH 法を実施する際に渡したマニュアル

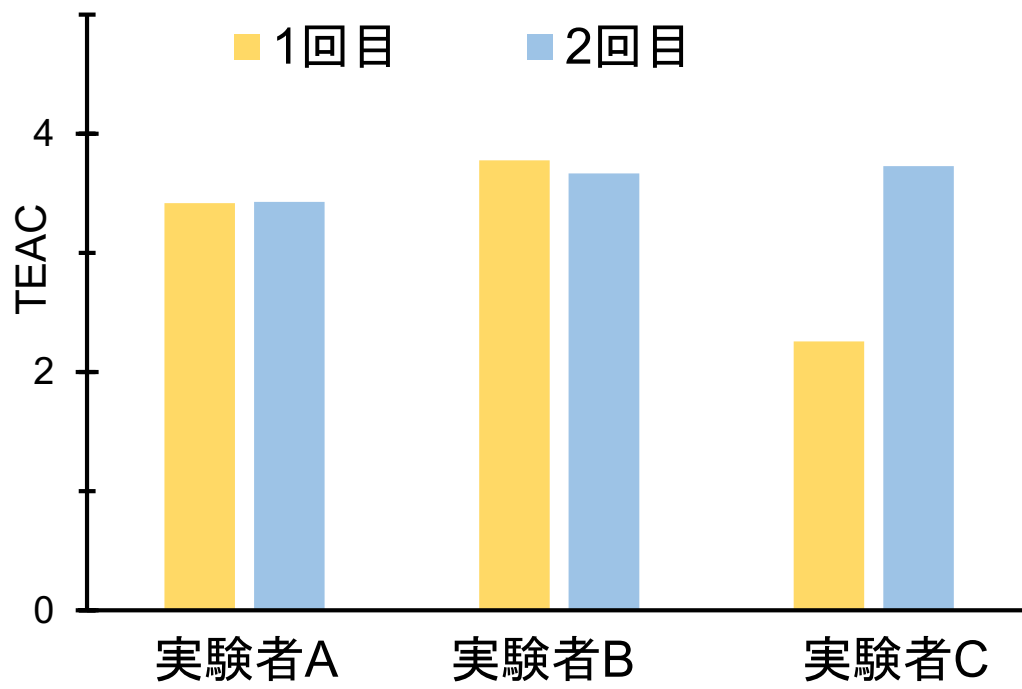


図 5. 実験者 A～C における没食子酸の TEAC
(黄色：1回目，青：2回目)