

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：27103

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21309

研究課題名(和文)酸化促進作用を考慮した酸化防止剤の最適利用法の確立と実食品への展開

研究課題名(英文) Establishment of optimum use of antioxidants by considering the effect and food applications

研究代表者

山内 良子 (Yamauchi, Ryoko)

福岡女子大学・国際文理学部・助手

研究者番号：50638575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、抗酸化活性測定法を応用した各種酸化防止剤の抗酸化力評価と酸化促進作用を定量的に測定し、実食品への応用について検討を行った。DPPH法で反応溶媒を変えて測定を行うこと、あるいはABTS法の結果と比較することにより、単一物質のみならず、実用化されている酸化防止剤についても酸化促進作用を示す可能性が明らかとなり、酸化防止剤の酸化促進作用の検出が可能であることが示唆された。一方、酸化防止剤はpHや鉄イオンの存在により大きな影響を受けることから、実食品への応用についてはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：This research is antioxidant look for an optimal way to contemplate for Pro-oxidant effect and put a way to practical food. In this study, it was clarified that the oxidation pro-oxidant effect can be detected by changing the reaction solvent of DPPH method or comparing with the result of ABTS method. As antioxidants are greatly affected by pH and the presence of iron ions, further study is required for food applications.

研究分野：食品学

キーワード：酸化防止剤 酸化促進作用 DPPH法

1. 研究開始当初の背景

近年、食の安全・安心志向の高まりから、食品添加物の利用においても天然物の利用が強く望まれている。食品添加物は、厚生労働省が成分規格や使用基準などを定め、使用を許可する指定制度がとられている。その中で、既存添加物は、天然由来の複雑な混合物であることから、有効成分の特定が困難であり規格基準の設定がなされていない。そのため、日本国内における長い食経験を理由に例外的に使用・販売が許可されているのが現状であり、その品質保証は重要な問題であると考えられる。また、既存添加物のうち酸化防止剤として利用される天然物は、強い抗酸化作用を有することから、酸化防止剤としての作用だけでなく、抗腫瘍作用やガン予防など疾病への応用が期待されている。しかしながら、強い抗酸化能を有する抗酸化物には、過剰摂取などにより酸化促進（プロオキシダント）として働く可能性があることが示唆されており、食品の品質劣化や健康への影響が懸念される。そのため、天然物の酸化防止剤としての利用は、有効性だけでなく、その危険性について併せて考慮することが重要である。

これまでに、天然由来の食品添加物を含む 20 種類の化合物の抗酸化作用の評価を行ってきた。その結果、抗酸化活性測定法の一つである DPPH 法は、同じ反応評価系を利用している ABTS 法と比較すると、分子内にカテコール構造を持つ化合物において、高い活性を有することを明らかにしている。これは、カテコール構造の再生反応に起因するものであると推察している。これまでに、分子内にカテコール構造などを持つ化合物は、抗酸化作用が強いだけでなく、反応過程において活性酸素を産生し、酸化反応促進作用を持つ可能性があることが報告があることから、カテコール構造の再生反応が、酸化促進作用を引き起こす主要因であると考えている。

酸化促進作用の評価には、まずその元となる抗酸化活性評価の反応系における活性酸素生成量の把握が重要となる。例えば、抗酸化物の一種であるケルセチンが、抗酸化能を示す過程では、分子内のカテコール構造がセミキノンラジカルを経てキノンへ還元される際に活性酸素を産生する。この活性酸素量を正確に把握することができれば、酸化促進作用の予測が可能となると考えられる。これまでの研究で明らかとしている DPPH 法におけるカテコール構造の再生反応による活性値の増大は、活性酸素の産生量と相関するとみなせることから、各種カテコール化合物による活性酸素の産生量の把握が理論上可能であると考えられる。そこで、DPPH 法を用いて各種酸化防止剤の抗酸化力の評価を行い、反応時の副産物である活性酸素量の把握を試みる。また、活性酸素の発生により脂質の過酸化反応が進行し、結果として食品の品質劣化を引き起こすことが予想される。そのた

め、併せて過酸化脂質量の把握を試みることにより、酸化抑制と酸化促進反応を総合的に判断可能な評価システムの構築を行う。

2. 研究の目的

本研究では、酸化促進作用を考慮した酸化防止剤の最適利用法の確立と実食品への展開を最終目的として、抗酸化活性測定法を応用した、各種酸化防止剤の抗酸化力評価と酸化促進作用を定量的に測定する方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

試料として、ポリフェノール類を中心に 16 種類の抗酸化物および既存添加物である 29 種類のチャ抽出物を用いた。

DPPH 法ラジカル消去活性測定法による測定は、試料溶液 200 μL 、100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.4) 800 μL 、0.20 mM DPPH 溶液 1 mL を添加し、常温暗所で 30 分間静置した。反応後、溶液の 517 nm における吸光度 (A_s) を分光光度計により測定した。試料溶液の代わりに EtOH を添加した場合の吸光度をコントロール (A_c) とした。また、0.20 mM DPPH 溶液の代わりに EtOH 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 (A_c) に対する試料添加時の吸光度の減少割合 ($A_c - A_s$) をもとに、阻害率 (%) と IC_{50} ($\mu\text{mol/mL}$) をそれぞれ求めた。さらに、標準物質をトロロックスとし、各試料のトロロックス等価活性値 (TEAC: $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$) を算出した。すべての測定は 3 回行い、平均値 \pm SD の形で示した。なお、本実験では、反応溶媒としてトリス-塩酸緩衝液/EtOH とアセトニトリル (MeCN) を用いた。また、pH の変化に関する実験では、トリス-塩酸緩衝液の pH を変化させることにより調整を行った。

脂質の過酸化反応の測定は TBA 法により行った。20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) 500 μL 、試料溶液 800 μL 、0.1% リノール酸混合溶液 1 mL を混合した。さらに、100 mM AAPH 200 μL を添加し、これを 37°C で 5 時間インキュベーションした。反応後、反応液 0.5 mL に 40 mM TBA 試薬 1.5 mL を加え、沸騰水中で 35 分間加熱し、冷却後、メタノール 0.5 mL 添加した。これを 96-well Microplate に 200 μL 分注し、検出波長 525nm、励起波長 560nm の条件で蛍光強度を測定した。得られた結果を基に、阻害率および IC_{50} を求めた。また、鉄の添加については 100、50、25 $\mu\text{g/mL}$ の鉄イオン溶液を調製し、リノール酸溶液に 500 μL 添加した。

4. 研究成果

本研究は、天然成分である抗酸化物の科学的根拠に基づいた有効活用を目指して、抗酸化物の酸化抑制作用および酸化促進作用を総合的に判断可能な評価システムの構築と

実際に用いられている天然酸化防止剤への展開を目的として行うものである。

まず、酸化促進反応の検出方法の検討を行った。酸化促進の要因としては、抗酸化物の化学構造の一部であるカテコール構造の再生・再反応に起因する活性増大が極めて重要と考えられる。これまでに、プロトン供与性溶媒であるトリス-塩酸緩衝液/EtOH系でのDPPHラジカル消去反応では、抗酸化物の再生反応が顕著に進行し、活性が増大する可能性が示唆されている。そこで本研究では、DPPH反応系でこの再生反応に起因する活性増大の程度を見積もることを試みた。具体的には、DPPH反応系で化学構造の再生反応が起こらないとされる非極性プロトン供与性溶媒(アセトニトリル:MeCN)を用いた測定系を用いてDPPHラジカル消去活性評価を試み、プロトン供与性溶媒系での活性値との比較を行うことにより、再生反応に起因する活性差を算出した。その結果、両反応系での活性差が、約 $1.11 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ であることが確認された。さらに、同じ反応原理による測定系であるABTS法との活性値の相関を確認したところ、トリス-塩酸緩衝液/EtOH系でのDPPH活性とABTS活性の間では、 $y=0.836x-0.425$, $r=0.84$ であったのに対し、MeCN系でのDPPH活性とABTS活性の間では、 $y=1.105+0.370$, $r=0.93$ となった。このことから、MeCN系での活性値が、ABTS法での活性値と極めて相関が高く、傾きが1に近い値をとることが判明した。これら一連の結果から、DPPH法で反応溶媒を変えて測定を行うこと、あるいはABTS法の結果と比較することにより、抗酸化物の再生反応に起因する活性増大の程度を見積もること、言い換えれば、酸化促進作用の可能性を見極める(検出する)ことが可能であることが示唆された。

そこで、既存添加物であり、実際に酸化防止剤として利用されているチャ抽出物29種類を用いて同様の測定を行い評価手法の検証を行った。その結果、トリス-塩酸緩衝液/EtOH系でのDPPH活性とABTS活性の測定値の差は、約 $0.46 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ であることが確認された。また、トリス-塩酸緩衝液/EtOH系でのDPPH活性とABTS活性の間では相関係数0.64となり、単一物質と同様にトリス-塩酸緩衝液/EtOH系でのDPPHラジカル消去反応の値が高かった。また、MeCN系でのDPPH活性は、一部の試料についてはアセトニトリルに不溶であったため測定不能であったが、測定可能であったサンプルについては、相関係数0.87と比較的高い相関が得られた。チャ抽出物は、高濃度にカテキン類を含む混合物であることが予想される。そのため、カテキン類を用いた単一成分での評価結果と同様の活性傾向が得られたものと考えられる。このことから、実際に使用されている酸化防止剤についても酸化促進作用の可能性について検出可能

であることが示唆された。また、このような酸化防止剤がプロオキシダントとして働く可能性があることが明らかとなった。

次に、実食品への応用を考え、pHの変化による活性値への影響についてpH7.0, 7.4, 8.0の3点で測定を行った。その結果、エピカテキン(EC)を用いた場合、IC₅₀値は68.80-102.63 μM (pH7.0-8.0)と1.49倍に増加し、pHの上昇と共に活性値の低下が確認された。さらに、他のカテキン類も同様にpH7.0-8.0の間でエピガロカテキン(EGC)は69.42-112.97 μM と1.62倍、エピカテキンガラート(ECg)は51.13-69.81 μM と1.37倍、エピガロカテキンガラート(EGCg)は45.94-64.78 μM と1.48倍となり、IC₅₀値の増加率は異なるものの、カテキン類においてpHの上昇と共に活性値が下がる傾向が確認された。この傾向は、他のフラボノイド類においても同様であった。このことから、1程度のpHのわずかな変動でも活性値に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。食品は、低pHから高pHまで様々な物が存在している。本研究の結果から、低pHにおいて、酸化防止剤は高い抗酸化活性を示す可能性が考えられる。そのため、低pHの食品にポリフェノール類を多く含有する酸化防止剤を添加する場合は、酸化防止剤が酸化促進剤として作用する可能性が考えられる。今後は、本研究で用いたpHよりさらに低いpHでの試験を行い、酸化促進作用の検出について検討する必要があると考える。

続いて、脂質過酸化反応における酸化促進因子の一つであるとされる鉄イオンの影響について検討を行った。具体的には、前述のpHの変動により酸化促進作用が確認されたカテキン類と2価の鉄イオンが抗酸化活性に及ぼす影響について検討を行った。その結果、用いたカテキン類のうちEC, EGCでは、鉄イオン共存による濃度依存的な酸化阻害への影響はほとんど認められなかった(図1: A,B)。しかしながら、ECg, EGCgでは、共存する鉄イオン濃度の増加に伴い、阻害率が顕著に低下する傾向が確認された。さらに、EGCgでは、鉄イオン濃度が200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の条件下で阻害率がマイナスとなり、酸化促進作用を示すことが確認された(図1: C,D)。このことから、強い抗酸化能を有するEGCgと一定濃度を超える鉄イオンが共存した場合に酸化促進作用を発現することが明らかとなった。これまでにEGCgは、緑茶等に多く含まれていることが多数報告されている。既存添加物であり、酸化防止剤として利用されているチャ抽出物中にもEGCgが多量に含まれていることが予想されることから、酸化促進作用を考慮した適量の酸化防止剤の利用が重要になると考えられる。また、食品中には鉄分子を含む成分が多数存在しているため、酸化防止剤の過剰利用は、食品の保存性に悪影響を及ぼす可能性が示唆される。

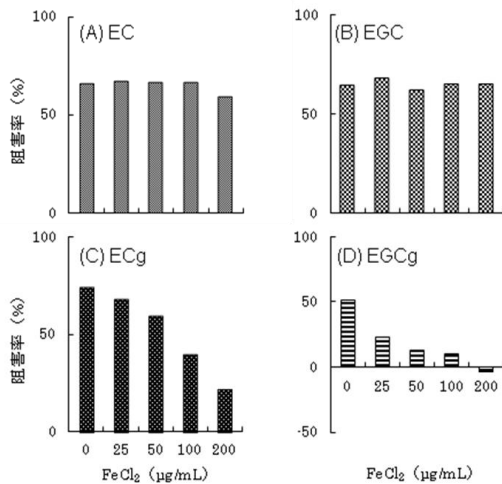


図1 鉄イオンが抗酸化活性へ及ぼす影響

以上、本研究では DPPH 法を用いて各種酸化防止剤の抗酸化力の評価を行い、反応時の副産物である活性酸素量の把握を試みた。その結果、DPPH 法で反応溶媒を変えて測定を行うこと、あるいは ABTS 法の結果と比較することにより、酸化防止剤の酸化促進作用の可能性について検出可能であることが示唆された。また、単一物質のみならず、実用化されている酸化防止剤についても酸化促進に働いている可能性が明らかとなった。続いて、pH の変動、特に低 pH の食品にポリフェノール類を多く含有する酸化防止剤を添加する場合は、酸化防止剤が酸化促進剤として作用する可能性が考えられた。さらに、ポリフェノール類と一定以上の鉄イオンの共存は酸化促進作用を引き起こすことから、酸化防止剤の過剰添加は、食品の保存性に悪影響を及ぼす可能性が示されたことから、今後さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ①山内良子、石井佐弥、草場悠里、小林弘司、島村智子、受田浩之、穂山浩、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、査読あり、Vol.42、No.5、2016、pp189-196

〔学会発表〕(計 3 件)

- ①石井佐弥、山内良子、小浜友紀子、世古なぎ、小林弘司、石川洋哉、抗酸化物のラジカル消去活性に及ぼす反応溶媒の影響、第 52 回化学関連支部合同九州大会、2015 年 6 月 27 日、福岡
- ②石井佐弥、山内良子、草場悠里、小林弘司、石川洋哉、抗酸化物の DPPH ラジカル消去反応における溶媒効果、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年 7 月 2 日、福岡

- ③草場悠里、山内良子、小林弘司、島村智子、受田浩之、杉本直樹、穂山浩、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

〔図書〕(計 0 件)

〔知的財産権〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 良子 (Yamauchi Ryoko)

福岡女子大学・国際文理学部・助手

研究者番号：50638575