

食品の抗酸化能評価に関する研究（第2報）

—H-ORAC分析法の検討—

徳田正樹
食品産業担当

Research of Antioxidant Ability Evaluation of the Food (2nd Report)

—Examination of Hydrophilic Oxygen Radical Absorbance Capacity (H-ORAC) Methods—

Masaki TOKUDA
Food Industry Section

要 旨

食品の抗酸化能に着目した商品開発や技術相談に対応するため、抗酸化能評価法である H-ORAC 法について、当センターでの評価体制の整備および評価技術の確立を目的として、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所が普及している「H-ORAC 分析法標準作業手順書」(以下手順書)に基づき分析を行った。また、DPFH 法による抗酸化能評価法の検討、ORAC 法の分析試料の調製法についての検討も併せて実施した。

管理試料フェルラ酸の測定値が、17,300~19,416 $\mu\text{mol TE/L}$ の範囲内であれば、ヘスペレチンの測定値も適正範囲内に入っていることが確認された。DPFH 法については、精度良く再現性の高い分析が実施できていた。H-ORAC 法を補完し、機能性成分に特徴のある農産物の検索にも活用できる可能性があることが示唆された。H-ORAC 法の試料調製法の違いによる ORAC 値の変動は、許容できる範囲にあることが確認できた。また、抽出液の保存性を検討した結果、抽出後少なくとも 150 日間は ORAC 値の変動はないと判断された。

1. はじめに

高齢化の進行により、健康に対する欲求は益々高まっている。このような中、食品の機能性を謳った健康食品や健康志向食品だけではなく、日々口にする食品の機能性についても注目度が増している。

こうした状況を受け、消費者が正しい機能性の情報を得て、商品選択ができるように、平成 27 年 4 月 1 日に機能性表示食品制度が始まった。約 1 年が経過した平成 28 年 3 月 16 日現在、届出数は 250 件となっており、制度への食品事業者の関心の高さがうかがわれる。

食品の高付加価値化やブランド化を図るうえで、機能性評価は重要な要素であり、当センターへの期待も大きい。

そこで、食品の抗酸化力に対する統一した指標の確立を目指し研究が進められている ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity ; 活性酸素吸収力) 法による評価技術の確立と評価体制の整備を目的に本研究に取り組んできた。

昨年度は、手順書に基づき分析を実施することで、分析の再現性や正確性について検討を行った。その結果、フェルラ酸、カフェ酸については、精度良く再現性の高い分析が実施できた。一方、蛍光強度減少パターン異なるヘスペレチンについては、ORAC 値

がやや低く出る傾向にあった。

そこで、本年度は残された課題であるヘスペレチンの H-ORAC 測定技術の確立について検討することとした。

併せて、DPFH 法による抗酸化能評価法の検討、ORAC 法の分析試料の調製法についての検討も加え、試料抽出から分析までの一連の操作が問題なく実施できる体制の整備を目指す。

2. 実験方法

2.1 分析試料

手順書で分析の品質管理試料として用いられているフェルラ酸および室間共同試験(以下室間試験)で用いられたヘスペレチン、カフェ酸を試料とした。

フェルラ酸、ヘスペレチン、カフェ酸各 100mg を MVA 溶液(メタノール 90 : 蒸留水 9.5 : 酢酸 0.5)で溶解し 100ml に定容したものを、Assay buffer (75mmol/L phosphate buffer (pH 7.4)) で 10 倍希釈したものを使用した。

2.2 H-ORAC 法

手順書に準じて分析を行った。

96 穴マイクロプレート (FALCON, #353072) を用い、プレートリーダー (DTX880 型, バックマン・コールター) にて測定を行った。

2.3 DPPH法

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構独立行政法人 九州沖縄農業研究センター (以下九州農研) で実施されている方法に準じて、96 穴マイクロプレート (FALCON, #353072) を用い、プレートリーダー (DTX880 型, バックマン・コールター) にて測定を行った。

2.4 試料調製方法の検討

2.4.1 供試試料

カボス搾汁残渣を、真空凍結乾燥 (以下 FD) および 30℃, 45℃, 60℃で通風乾燥した乾燥粉末を供試した。

2.4.2 抽出液の調製

乾燥粉末 1g と海砂 5g を混合後、ヘキサン:ジクロロメタン (1:1)10ml を加え、超音波洗浄槽で 37℃, 5 分処理した後、遠心分離 (1,600×g, 10min) し上清と沈殿物を分離した。沈殿物に溶媒を加え、同じ操作を 4 回繰り返す。得られた上清を親油性画分とした。親油性画分抽出後の沈殿物に MMA 溶液 10ml を加え、超音波洗浄槽で 37℃, 5 分処理した後、遠心分離 (1,600×g, 10min) し上清と沈殿物を分離した。沈殿物に溶媒を加え、同じ操作を 4 回繰り返す。得られた上清を親水性画分とし、測定試料とした。

また、九州農研にて高速溶媒抽出装置 (ASE-350, Dionex 社) を用いて調製した抽出液を抽出率の比較試験に供試した。

3. 結果及び考察

3.1 H-ORAC 法による分析

ヘスペレチンの測定値の解析結果を Table 1 に示した。

Table 1 H-ORAC 法によるヘスペレチンの測定値の解析結果

試料名	H27	H26 (参考)	(室間試験)
測定回数	12	18	—
分析点数	64	72	—
平均値 ($\mu\text{mol TE/L}$)	20,958	20,056	22,829
標準偏差 ($\mu\text{mol TE/L}$)	411.9	823.8	721.0
変動係数 (%)	2.0	4.1	4.8
真度充足率 (%)	75	22	—
精度充足率 (%)	100	93	—

昨年実施した試験では、室間試験の結果と比較して ORAC 値がやや低く出る傾向が見られたので、分析中の温度保持に留意し、試験を実施した。

12 回の測定で 64 点の測定値を得た。得られた測定値を解析した結果、平均値 20,958 $\mu\text{mol TE/L}$ 、標準偏差 412 $\mu\text{mol TE/L}$ 、変動係数 2.0% であった。室間試験の結果と比較すると、若干ではあるが ORAC 値がやや低く出る傾向にあったが、平均値は適正範囲内であった。(Fig. 1)

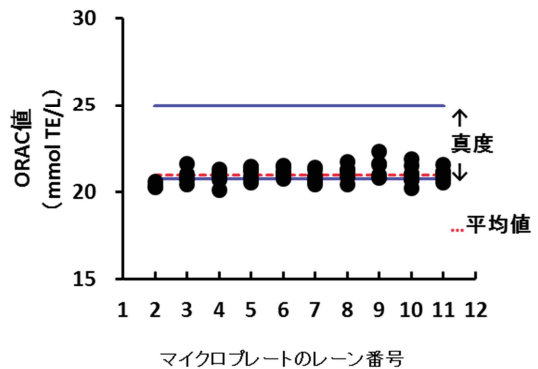


Fig. 1 ヘスペレチンの分析結果

室間試験の結果を利用して真度 (ヘスペレチンの室間試験での平均値 \pm 室間再現標準偏差の 2 倍: 22,829 \pm 2,102 $\mu\text{mol TE/L}$) と精度 (Z スコア $2: Z = |$ ヘスペレチンの測定値 $-$ ヘスペレチンの測定値の平均値 $| \div 721$ (室間試験での中間標準偏差)) を計算したところ、真度充足率は、昨年度の 22% から 75% に大きく向上し、精度充足率は 93% から 100% となった。

本分析ではマイクロプレートの 2~11 レーンを使用して測定を行うが、2 レーンを使用したヘスペレチンの測定結果は、適正な真度の範囲内に入らず常に低い数値となった。本分析に使用するプレートリーダーには機種に固有な特性があり、測定するレーンにより、ORAC 値が大きくなったり小さくなったりすることがわかっている。したがって、この傾向は当センターの機器の特性によるものと考えられたので、ヘスペレチンタイプの化合物の測定には 2 レーン以外を使用することとした。

参考までに、今回の測定結果から 2 レーンでの結果を除外すると、真度充足率は 79% に向上する。

さらに、当センターの機器で、各レーン間の測定値にどの程度の変動があり、その変動が許容できる範囲にあるか解析を行った。

各レーン毎の測定値の解析結果を Table 2, Fig. 2 に示した。

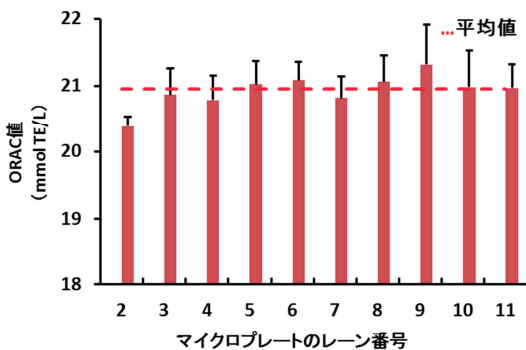
一元配置分散分析の結果、P 値は 0.120 となり、有意水準を 5% に設定した場合、グループ間に有意差はなく、レーン間の ORAC 値の変動は許容できる範囲であることが確認された。

また、ヘスペレチンの測定値と管理試料として同時に分析を行うフェルラ酸の測定値との関係に着目したところ、ヘスペレチンの測定値が真度を満たさず低い数値を示した場合、同時に測定したフェルラ酸の測定値が真度を満たしてはいるものの、

Table 2 ヘスペレチンの各レーン毎の測定値の解析結果

レーン番号	平均値 ($\mu\text{mol TE/L}$)	標準偏差 ($\mu\text{mol TE/L}$)	変動係数 (%)	P-値
2	20,381	161.4	0.8	0.120
3	20,869	395.6	1.9	
4	20,791	357.7	1.7	
5	21,023	348.5	1.7	
6	21,086	272.5	1.3	
7	20,823	324.9	1.6	
8	21,058	401.5	1.9	
9	21,321	587.2	2.8	
10	20,982	550.8	2.6	
11	20,969	351.6	1.7	

Fig.2 ヘスペレチンの各レーン毎の測定値



低い傾向にあることがわかった。

フェルラ酸とヘスペレチンの測定結果をプロットしてみると、フェルラ酸の測定値が 17.3mmol TE/L 以上の場合、ヘスペレチンの ORAC 値が全て真度を満たしていることが確認できた。

(Fig.3)

以上の結果より、ヘスペレチンタイプの化合物の分析には、分析中の温度保持の徹底、マイクロプレートの 2 レーン以外での分析を前提条件とし、同時に分析する管理試料フェルラ酸の測定値が 17,300~19,416 $\mu\text{mol TE/L}$ の範囲内に入っていることで、ヘスペレチンの測定値も適正範囲に入っていると判断できることがわかった。

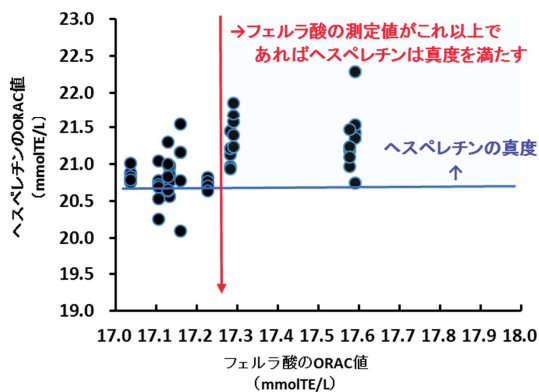


Fig.3 フェルラ酸とヘスペレチンの測定値の関係

3.2 DPPH 法による分析

DPPH 法は、分析時間が短時間かつ分析が簡易であることが利点である。ORAC 法による分析の前段階として、多くの検体から抗酸化能の強いものを選別する際に利用可能であると考えられるので、当センターの機器を使用して、正確な分析が実施可能か検討した。

各試料の測定値の解析結果を Table 3 に示した。

Table 3 DPPH 法による測定値の解析結果

試料名	フェルラ酸	ヘスペレチン	カフェ酸
測定回数	3	3	3
分析点数	12	12	11
平均値 (mmol TE/L)	2.42	0.42	5.36
標準偏差 (mmol TE/L)	0.01	0.01	0.07
変動係数 (%)	0.46	1.78	1.22

それぞれ 3 回の測定を行った結果、フェルラ酸については、平均値 2.42mmol TE/L、標準偏差 0.01mmol TE/L、変動係数 0.46%、ヘスペレチンについては、平均値 0.42mmol TE/L、標準偏差 0.01mmol TE/L、変動係数 1.78%、カフェ酸については、平均値 5.36mmol TE/L、標準偏差 0.07mmol TE/L、変動係数 1.22%であった。いずれの試料とも、精度良く再現性の高い分析が実施できていることがわかった。

また、H-ORAC 法の分析では抗酸化能はカフェ酸>ヘスペレチン>フェルラ酸の順に強かったが、DPPH 法ではカフェ酸>フェルラ酸>ヘスペレチンとなり、異なる傾向を示した。

以上のことから、H-ORAC 法による分析の前段階として DPPH 法を利用することで、多くの検体から抗酸化能の強いものを効率的に選別できることがわかった。さらに、H-ORAC 法と DPPH 法で異なる傾向を示す化合物も存在するため、それぞれの分析法を補完し、機能性成分に特徴のある農産物の検索にも活用できる可能性があることが示唆された。

3.3 試料調製方法の検討

3.3.1 抽出方法の検討

H-ORAC 法の分析試料調製法として、高速溶媒抽出装置を使用する方法とバッチ処理による方法があるが、調製方法の違いにより、ORAC 値ほどの程度の差があるか検討した。

各抽出液の測定結果を Fig.4 に示した。

各処理温度間で t 検定を行った結果、P-値は FD が 0.836、30°C が 0.219、45°C が 0.640、60°C が 0.087 であった。有意水準を 5% に設定した場合、抽出方法の違いによる有意差はなかった。

以上の結果より、H-ORAC 法の試料調製法の違いによる ORAC 値の変動は、許容できる範囲にあることが確認できた。

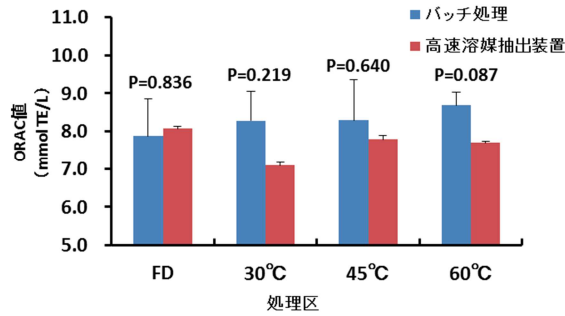


Fig 4 抽出方法の違いによるH-ORAC値

3.3.2 保存性の検討

手順書には、試料抽出方法や抽出液の使用期限については記載されていない。そこで、バッチ処理により調製した抽出液を -30°C で保管し、30日毎にH-ORAC値を測定した。

測定結果をFig 5に示した。

回帰分析の結果、いずれの処理温度においても、P値が0.05以上となり、傾きは統計上0（ゼロ）と区別できないため、抽出後のORAC値の変動はないと判断された。

以上の結果より、 -30°C で保管すれば、抽出後少なくとも150日間はORAC値の変動はないと判断された。

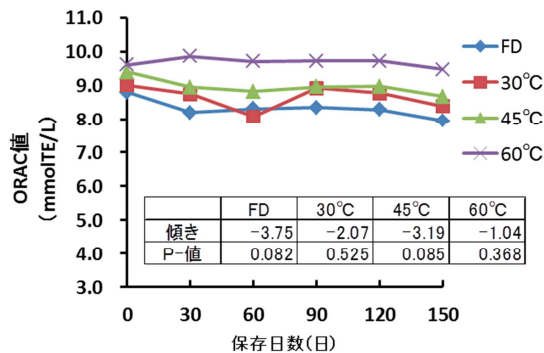


Fig 5 抽出液の保存中のH-ORAC値の変化

4. まとめ

機能性表示食品制度が始まったことで、機能性に着目した商品開発の機運が高まっており、今後、当センターへの技術相談も増加することが予想される。

本研究では、抗酸化能に着目した商品開発や技術相談に対応するため、食品の抗酸化能評価の標準手法として定着が図られているORAC法について、当センターでの評価体制の整備および評価技術の確立を行った。

当センターの施設環境で、フェルラ酸、カフェ酸については精度良く再現性の高い分析が実施可能となった。蛍光強度減少パターンの異なるヘスペレチンについても、同時に測定するフェルラ酸の測定値を指標として、正確な分析が可能となることがわかり、H-ORAC法についての分析技術を確立することができた。

併せて実施した試料調製方法の検討により、試料抽出から分析までの一連の操作が問題なく実施できる体制を整備することができた。

また、DPPH法についても検討した結果、H-ORAC法による分析の前段階としての利用により、多くの検体から抗酸化能の強いものを効率的に選別できることがわかった。さらに、H-ORAC法、DPPH法それぞれの分析法を補完し、機能性成分に特徴のある農産物の検索にも活用できる可能性があることが示唆された。

今回、抗酸化能評価法としてH-ORAC法、DPPH法が分析可能になったことで、今後の商品開発や品質評価への活用が期待される。

参考文献

- (1) 食品総合研究所：H-ORAC分析法標準作業手順（2013）
- (2) 九州沖縄農業研究センター：DPPHラジカル消去活性測定法（2009）
- (3) 渡辺純，沖智之，竹林純，山崎光司，津志田藤二郎，食品の抗酸化能測定法の統一化を目指して，化学と生物（2009）
- (4) 津志田藤二郎，標準となる抗酸化能測定法の選定と抗酸化指標の表示について，食品と開発（2010）
- (5) 大脇進治，食品の抗酸化指標「ORAC」分析とその展望，食品と開発（2010）
- (6) 山梨県工業技術センター研究報告：地域特産物の抗酸化力向上に関する研究（2011）
- (7) Watanabe et al. , *Analytical Sciences*（2012）
- (8) 消費者庁HP：機能性表示食品の届出情報（2016）