

食品の抗酸化能評価に関する研究

—H-ORAC分析法の検討—

徳田正樹・廣瀬正純

食品産業担当

Research of Antioxidant Ability Evaluation of the Food

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

Masaki TOKUDA・Masazumi HIROSE

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。

フェルラ酸、カフェ酸については、手順書にある室間共同試験(以下室間試験)の結果と比較しても、精度良く再現性の高い分析が実施できていた。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。今後、さらに検討を重ねる必要がある。ケルセチン、カボス果汁については、精度、再現性ともに問題ないと考えられた。

当センターのプレートリーダーでの、各レーン間の測定値の変動について解析を行った。フェルラ酸についてのみ、有意な差があると判断されたが、分析の再現性が高いことが理由であると考えられた。したがって、レーン間の ORAC 値の変動は許容できる範囲にあることが確認できた。

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。

機能性成分として多くのものが知られているが、とりわけ「抗酸化物質」に関しては、過剰な活性酸素を消去することで生活習慣病を防止し、健康を維持する機能があるということで、消費者の認知度も高い。

食品の抗酸化能については、これまでに多くの研究が行われており、その評価法についても様々な方法がある。米国で開発された ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity ; 活性酸素吸収力) 法は、抗酸化能評価の標準手法として、欧米において広く認知されており、すでに ORAC 値が表示された商品も店頭に並んでいる。

日本でも、大手食品企業や大学、国立研究機関により AOU (Antioxidant Unit) 研究会が設立され、食品の抗酸化力に対する統一した指標の確立を目指し、ORAC 分析法の公定法化(分析値の妥当性確認)の研究を行っており、本法が抗酸化能評価の標準手法として定着することが想定される。

さらに、消費者庁においては食品の機能性表示制度に関する検討がなされ、平成 27 年度には新たな食品表示制度が施行されることとなった。

こういったことから、今後益々、食品への抗酸化能測定値の表示に対する期待が高まることが予想され、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にも、当センターでの ORAC 法による評価技術の確立が必要である。

そこで、本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することとした。

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試験で用いられたヘスペレチン、カフェ酸を試料とした。

さらに、代表的な抗酸化物質であるケルセチンおよび大分県の特産であるカボス果汁についても分析を行った。

フェルラ酸、ヘスペレチン、カフェ酸、ケルセチンについては、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 (pH7.4) で 10 倍希釈したものを使用した。

また、カボス果汁は搾汁液を Assay buffer で 10 倍希釈して使用した。

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。

3. 結果及び考察

3.1 H-ORAC 法による分析

3.1.1 分析結果の解析

各試料の測定値の解析結果を Table 1 に示した。

Table 1 H-ORAC 法による測定値の解析結果

試料名	フェルラ酸	カフェ酸	ヘスペレチン	ケルセチン	カボス
測定回数	25	12	18	6	5
分析点数	70	50	72	30	21
平均値 (μmol TE/L)	17,238	31,645	20,056	26,490	6,137
標準偏差 (μmol TE/L)	488.5	683.7	823.8	1347.1	241.1
変動係数 (%)	2.8	2.2	4.1	5.1	3.9
真度充足率 (%)	100	100	22	-	-
精度充足率 (%)	100	98	93	-	-

真度：室間試験での平均値±室間再現標準偏差の2倍

精度：Zスコア<2：Z=|測定値-測定値の平均値|÷室間試験での中間標準偏差

フェルラ酸については、25 回の測定で 70 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 17,238 μmol TE/L、標準偏差 489 μmol TE/L、変動係数 2.8%であった。室間試験の結果と比較しても、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。

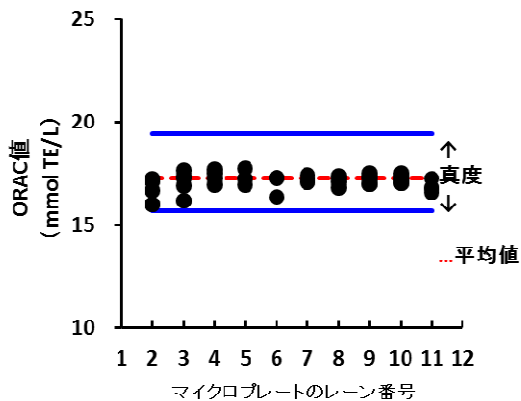


Fig. 1 フェルラ酸の分析結果

また、全ての測定値が、手順書による真度（フェルラ酸の室間試験での平均値±室間再現標準偏差の2倍：17,552±1,864

μmol TE/L）および精度（Zスコア<2：Z=|フェルラ酸の測定値-フェルラ酸の測定値の平均値|÷757（室間試験での中間標準偏差））を満たしており、分析の信頼性も充分であると考えられる。（Fig. 1）

カフェ酸については、12 回の測定で 50 点の測定値を得た。解析の結果、平均値 31,645 μmol TE/L、標準偏差 684 μmol TE/L、変動係数 2.2%であり、フェルラ酸同様、精度良く再現性の高い分析が実施できていた。室間試験の結果を利用して真度と精度を計算してみたところ、精度について 1 点のみ Zスコアが 2 以上となったが、真度に関しては全ての測定値が適正な範囲内であったことから、分析操作時に偶然発生した軽微なエラーが原因ではないかと考えられる。分析の信頼性については、全く問題ないと考えている。（Fig. 2）

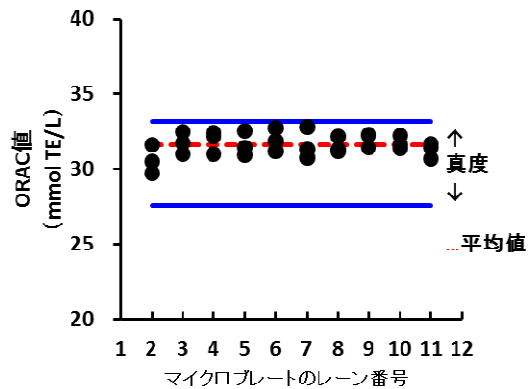


Fig. 2 カフェ酸の分析結果

ヘスペレチンについては、18 回の測定で 72 点の測定値を得た。解析の結果、平均値 20,056 μmol TE/L、標準偏差 824 μmol TE/L、変動係数 4.1%であり、室間試験の結果と比較すると、ORAC 値がやや低く出る傾向にあった。（Fig. 3）

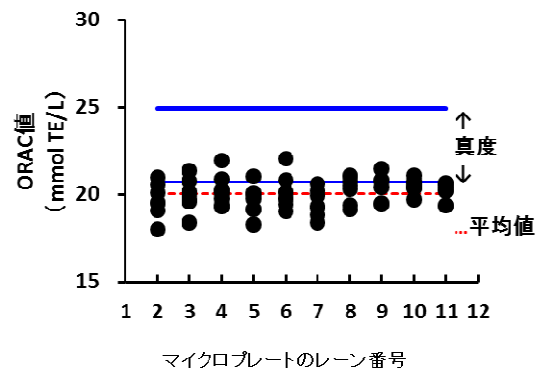


Fig. 3 ヘスペレチンの分析結果

全ての分析実施時に品質管理試料であるフェルラ酸を 2 点以上分析することで、分析の信頼性を確認していることから、分析自体に問題はないものと考えられる。また、標準偏差や変動係数も特に異常値を示しているわけではない。真度と精度を計算してみると、精度に関しては非常に高いことから、分析操作そのものに問題がある可能性は低く、今のところ ORAC 値が低く出る決定的な原因については不明である。

H-ORAC 測定において、ヘスペレチンのようにただらと蛍光強度が減少する挙動を示すタイプの化合物とフェルラ酸やカフェ酸のように蛍光強度が減少しない時間があり、その後、急激に蛍光強度が減少する挙動を示す2つのタイプの化合物があることが確認されている。今回、フェルラ酸、カフェ酸については、精度、再現性ともに充分満足できる結果が得られた一方、ヘスペレチンについては再現性については問題なかったが、測定値が低めに出るという結果となった。蛍光強度減少のパターンの違いが、その原因となった可能性も考えられるので、今後、ヘスペレチンタイプの化合物については、さらに検討を重ねる必要がある。

ケルセチンについては、6 回の測定で 30 点の測定値を得た。解析の結果、平均値 26,490 $\mu\text{mol TE/L}$ 、標準偏差 1,347 $\mu\text{mol TE/L}$ 、変動係数 5.1%であり、精度、再現性ともに問題ないことが確認できた。また、ケルセチンについては、蛍光強度減少の挙動がフェルラ酸タイプを示したので、ORAC 値についても信頼できるものと考えられる。(Fig 4)

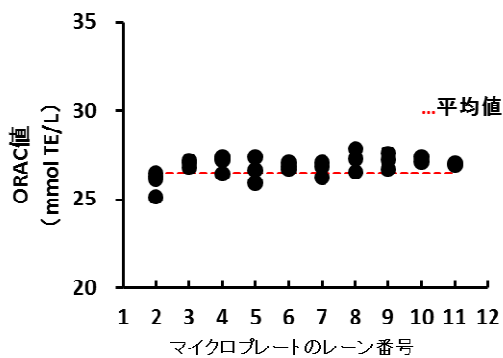


Fig 4 ケルセチンの分析結果

カボス果汁については、5 回の測定で 21 点の測定値を得た。解析の結果、平均値 6,137 $\mu\text{mol TE/L}$ 、標準偏差 241 $\mu\text{mol TE/L}$ 、変動係数 3.9%であった。室間試験のミカンの ORAC 値と同程度であることから、妥当な数値ではないかと考えられる。(Fig 5)

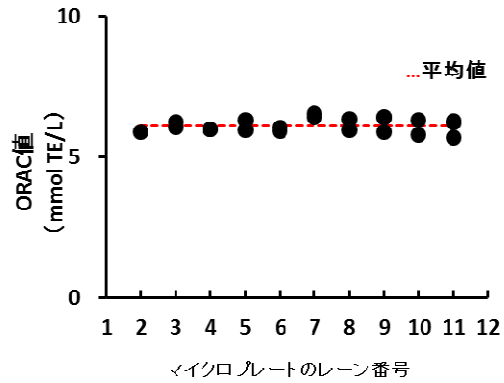


Fig 5 カボス果汁の分析結果

あり、理由は不明であるが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。また、同一メーカーの機種を用いてもこの現象は起こり、ORAC 値が大きくなったり小さくなったりするレーンは異なる。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。

フェルラ酸の各レーン毎の測定値の解析結果を Table 2, Fig 6 に示した。

Table 2 フェルラ酸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	16,839	413.1	2.5	0.028
3	17,236	585.4	3.4	
4	17,629	627.4	3.6	
5	17,356	346.3	2.0	
6	17,001	365.9	2.2	
7	17,341	264.7	1.5	
8	17,278	341.8	2.0	
9	17,503	316.5	1.8	
10	17,353	479.3	2.8	
11	16,889	592.8	3.5	

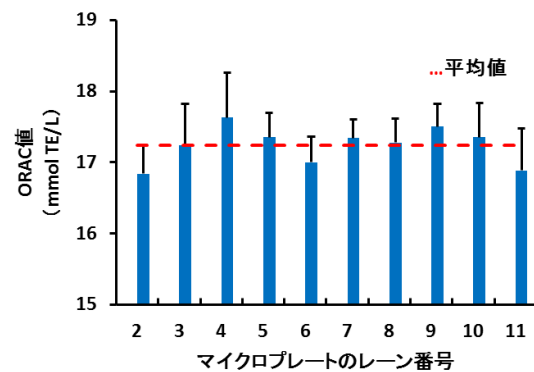


Fig 6 フェルラ酸の各レーン毎の測定値

3.1.2 マイクロプレートの各レーン毎の分析結果の解析

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

一元配置分散分析の結果、P-値は0.028であった。有意水準を

5%に設定した場合、統計的に有意となり、グループ間で有意差があることが示された。そのため、フェルラ酸についてはレーン間でORAC値の平均値に有意な差があると統計的に判断される。

しかし、フェルラ酸のORAC値については、真度、精度ともに問題はないことから、分析自体にも問題はないと考えられる。フェルラ酸で有意差が出た理由は、分析の再現性が高いためではないかと推測される。通常はレーン特異的なORAC値の変動より、分析手技による変動の方が大きくなり、有意な差は出ないのではないかと考えられる。

同様にカフェ酸、ヘスペレチンについての解析結果を、それぞれTable 3, 4, Fig 7, 8に示した。

P値はそれぞれ 0.131, 0.301 であった。有意水準を 5%に設定した場合、グループ間に有意差はなかった。

以上の結果より、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。

Table 3 カフェ酸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	30,760	831.4	2.7	0.131
3	31,770	553.4	1.7	
4	31,918	547.9	1.7	
5	31,636	655.7	2.1	
6	31,947	614.0	1.9	
7	31,503	984.7	3.1	
8	31,710	693.1	2.2	
9	31,910	493.1	1.5	
10	31,955	415.7	1.3	
11	31,343	443.6	1.4	

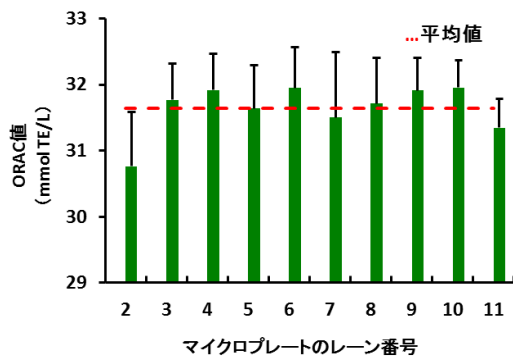


Fig. 7 カフェ酸の各レーン毎の測定値

4. 今後の計画

フェルラ酸タイプの蛍光強度減少のパターンを示す化合物については、当センターでH-ORAC法による抗酸化能測定が可能となったことから、ヘスペレチンタイプの化合物について、ORAC値が低くなる原因を解明し、H-ORAC分析法の評価体制の整備および評価技術の確立を目指す。併せて、センター独自の分析手順書を作成

Table 4 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	19,676	976.3	5.0	0.301
3	20,005	942.5	4.7	
4	20,226	864.3	4.3	
5	19,643	882.6	4.5	
6	20,136	938.3	4.7	
7	19,502	801.8	4.1	
8	20,322	780.1	3.8	
9	20,399	805.5	3.9	
10	20,484	428.7	2.1	
11	20,167	530.6	2.6	

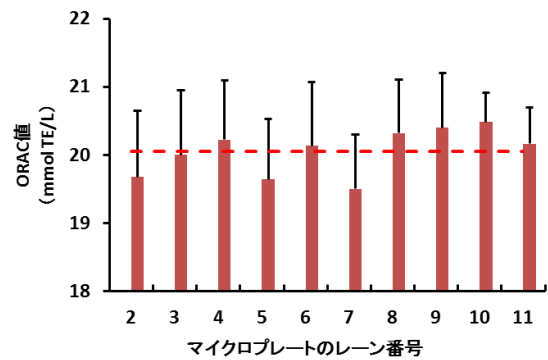


Fig. 8 ヘスペレチンの各レーン毎の測定値

する。

DPPH法について、分析の再現性や精度の検討を行い、ORAC法を補完する分析法として技術の確立を図っていく。

また、手順書では分析に用いる試料の、食品からの抽出法については十分検討されていないので、試料調製法や抽出液の保存性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を整備したいと考えている。

参考文献

- (1) 食品総合研究所他：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)