

# 酸化防止剤力価評価を目的としたDPPHおよびABTSラジカル消去能評価法の特性比較

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	山内,良子 深水,さやか 小浜,友紀子 島村,智子 柏木,丈拡 受田,浩之 穠山,浩 松井,利郎 石川,洋哉
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	40巻2号
掲載ページ	p. 55-63
発行年月	2014年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 酸化防止剤力価評価を目的としたDPPH およびABTSラジカル消去能評価法の特性比較

山内良子<sup>\*1</sup>・深水さやか<sup>\*1</sup>・小浜友紀子<sup>\*1</sup>  
島村智子<sup>\*2</sup>・柏木丈拵<sup>\*2</sup>・受田浩之<sup>\*2</sup>  
穂山 浩<sup>\*3</sup>・松井利郎<sup>\*4</sup>・石川洋哉<sup>\*1§</sup>

\* 1 福岡女子大学国際文理学部

\* 2 高知大学農学部

\* 3 国立医薬品食品衛生研究所

\* 4 九州大学農学研究院

### Comparative DPPH and ABTS Radical Scavenging Activity Assays for Evaluating Natural Antioxidants as Food Additives

YAMAUCHI Ryoko<sup>\*1</sup>, FUKAMIZU Sayaka<sup>\*1</sup>, KOHAMA Yukiko<sup>\*1</sup>,  
SHIMAMURA Tomoko<sup>\*2</sup>, KASHIWAGI Takehiro<sup>\*2</sup>, UKEDA Hiroyuki<sup>\*2</sup>,  
AKIYAMA Hiroshi<sup>\*3</sup>, MATSUI Toshiro<sup>\*4</sup> and ISHIKAWA Hiroya<sup>\*1§</sup>

\* 1 *Department of Food and Health Sciences, International College of Arts Sciences,  
Fukuoka Women's University, 1-1-1, Kasumigaoka, Higashi-ku, Fukuoka 813-8529*

\* 2 *Faculty of Agriculture, Kochi University, B-200 Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502*

\* 3 *Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501*

\* 4 *Faculty of Agriculture, Graduate School of Kyushu University,  
6-10-1, Hakozaki, Higasi-ku, Fukuoka 812-8581*

To assess the quality of natural antioxidants used as food additives, it is important to establish method for evaluating antioxidant activity. In this study, the DPPH and ABTS radical scavenging methods were evaluated. The antioxidant activities of 21 reference antioxidants, including flavonoids, polyphenols, vitamins, amino acids, and peptides, were determined by these methods. In both assays, a catechol and a pyrogallol moiety contributed to antioxidant activity. In addition, a 3-hydroxyl group in the C-ring of the flavonoids and the gallic acid ester moiety of the catechins were also important for activity. The antioxidant activities determined by DPPH and ABTS were similar with the exception of catechol compounds, for which values were  $\sim 1.3 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$  higher in the DPPH assay than in the ABTS assay. We conclude that DPPH reflects reactivation of the catechol moiety of the antioxidants. A correlation study of DPPH and ABTS with the FRAP method showed that the DPPH method reflected ferric-reducing ability more precisely than did the ABTS assay. We conclude that the DPPH assay would be suitable as a standard method for evaluating natural antioxidants as food additives.

(Received Oct. 17, 2013 ; Accepted Jan. 20, 2014)

**Key words** : antioxidants, polyphenol, DPPH, ABTS, catechol compound

酸化防止剤, ポリフェノール, DPPH法, ABTS法, カテコール構造

---

\* 1 〒813-8529 福岡県福岡市東区香住ヶ丘1-1-1  
§ Corresponding author, E-mail: ishikawa@fwu.ac.jp  
\* 2 〒783-8502 高知県南国市物部乙200  
\* 3 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1  
\* 4 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

現在、日本国内で使用されている食品添加物は、食品衛生法において指定対象である化学合成物・天然物と、指定対象外である天然香料・一般飲食物添加物に大別されている。さらに、指定対象である食品添加物は、指定添加物と既存添加物に分類され、指定添加物は平成25年8月6日現在436品目、既存添加物は平成25年2月7日現在365品目が登録されている<sup>1),2)</sup>。指定添加物とは、国が安全性、有効性を確認した合成添加物であり、成分含量または成分組成に基づく規格基準が設定されている。一方、既存添加物は、天然由来の複雑な混合物であるものが多く、その有効成分や成分組成の特定が困難である。既存添加物の使用は、平成7年の食品衛生法の改正以降経過措置的に認められているが、有効成分含量あるいは成分組成を指標とした規格基準の設定が極めて難しい状況にあることから、新たな品質規格基準の設定が急務となっている。酸化防止剤においても、その有効性である抗酸化能に基づく新たな品質評価基準の策定が重要な検討課題の一つとなっている。

抗酸化能に基づく品質評価には、抗酸化能評価の公定法策定が必要不可欠であり、そのためには公定法候補の選定とその妥当性の評価が最重要課題となる。抗酸化能評価法として、これまでに原理や操作性の異なる多種多様な方法が報告<sup>3)</sup>されており、その選択は極めて難しい。抗酸化能の評価法は、その測定原理に基づきHydrogen Atom Transfer (HAT) 機構とSingle Electron Transfer (SET) 機構に分類される。HAT機構は、抗酸化物質がラジカルに水素原子を供与することで基質の酸化を抑制する原理に基づくものであり、近年注目を集めたoxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法<sup>4)</sup>やlow density lipoprotein (LDL) 酸化法<sup>5)</sup>などがこれに属する。一方、SET機構は、抗酸化物質がラジカルや酸化物などに1電子を供与することで基質を還元する原理に基づくものであり、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法<sup>6)</sup>、2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 法<sup>7)</sup>、ferric reducing antioxidant potential (FRAP) 法<sup>8)</sup>などがあげられる。この他に、ラジカルをスピントラップ剤の使用により測定する電子スピン共鳴 (ESR) 法<sup>9)</sup>や酵素反応を利用した活性酸素種 (スーパーオキシド) 消去活性測定法である2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium,monosodium salt (WST-1) 法<sup>10)</sup>など様々な測定法が存在する。

私たちは、これまでの研究において、既存添加物の酸化防止剤規格試験法 (規格試験法) 候補の選定と妥当性評価を進めてきた<sup>11)</sup>。具体的には、規格試験法候補の選定条件を、①過去の研究において使用されてきた実績があること、②短時間での測定が可能であること、③特殊な測定機器を必要としない汎用性の高い分光学的測定法であることの3項目とし、ラジカル消去活性測定法であるDPPH法とABTS法、活性酸素消去活性測定法で

あるWST-1法を候補として選定した。この3法を用いて、既存添加物のうち単一化合物からなる酸化防止剤および複数成分からなる天然由来酸化防止剤の測定を行い、得られた結果を比較した。各測定法のプロトコルを最適化し測定を実施した結果、いずれの測定法も研究室間での再現性が高いことが確認されたが、WST-1法に関しては他の2法と比較すると再現性が若干劣ること、また疎水性酸化防止剤への適用が困難なことなどが明らかになった。このように、抗酸化活性評価法の公定法候補として、現状ではDPPH法とABTS法が有力な状況であるが、規格試験法を策定するためには両者の違いを明らかにし、最適な抗酸化能評価法を選定することが急務となっている。

一方、食品の酸化反応において、金属イオンは反応促進因子として知られており<sup>12)</sup>、金属イオンの酸化が種々のラジカル生成の引き金になる可能性が高い。したがって、酸化防止剤として金属イオンに対する酸化抑制効果である還元能も重要な機能の一つと考えられる。DPPH法とABTS法はいずれもSET機構に基づく評価法であるが、金属イオンの還元能評価も同機構に基づくため、DPPH法およびABTS法での測定値には金属イオンに対する還元能が反映されている可能性が高い。この金属イオンに対する還元能の反映度も、規格試験法の選定における重要な判断要因と考えられる。

本研究では、酸化防止剤規格試験法の選定を目的として、まず21種類の抗酸化物を用いてDPPH法およびABTS法による抗酸化能評価を行い、DPPHおよびABTSラジカルに対する各種抗酸化物の反応特性の違いを検証した。さらに、DPPH法とABTS法を鉄イオンに対する還元能評価法であるFRAP法と比較し、両ラジカル消去能測定法に対する金属イオン還元能の反映度を検討した。

## 実験方法

### 1. 試薬

測定試料として、没食子酸、モリン、ケルセチン、セサモール、*trans*-フェルラ酸 (東京化成工業)、エラグ酸、(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキンガラート、(-)-エピガロカテキンガラート、ケンフェロール、ミリセチン (以上シグマ)、カフェ酸、(-)-エピガロカテキン、L-システイン (以上ナカライテスク)、ケルセチン3-グルコシド (常盤植物科学研究所)、グルタチオン、L-アスコルビン酸、ルテオリン、ピロカテコール、ルチン、(+/-)- $\alpha$ -トコフェロール (以上和光純薬工業) を用いた。なお、ケンフェロールおよびルテオリンは純度90%の試薬を用い、その他測定試料に関しては純度95%以上のものを使用した。なお、試料溶液作製時には各試薬純度を基に溶液濃度を決定した。また、標準物質として(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (トロロックス) (SIGMA) を使用した。試験試薬は、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

(DPPH) (和光純薬工業), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline - 6 - sulphonic acid) (ABTS) (Roche Diagnostics), ペルオキシ二硫酸カリウム (和光純薬工業), 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) (東京化成工業), 塩化鉄 (Ⅲ) 六水和物 (ナカライテスク) を使用した。試薬は, 特別の記載がない限りの特級試薬を用いた。吸光度測定には, U-2001分光光度計 (日立ハイテクノロジーズ) を用いた。

2. 試料溶液の調製

試料溶液は, 各測定試薬約 5 mg を少量の99.5%エタノール (和光純薬工業) あるいはMilliQ水 (グルタチオン, システインのみ) を添加し, 卓上型超音波バス (ヤマト科学) を用いて短時間の超音波処理 (110W, 15~30秒間) を行い, 完全に試料を溶解させた。その後, エタノール溶液を用いて各希釈溶液を作製した。

3. DPPHラジカル消活性測定法 (DPPH法)

DPPH法による測定は, 既報と同様に行った<sup>11)</sup>。DPPH溶液は, 99.5%エタノールに溶解した後, 常温暗所に2時間放置した。試験管に試料溶液200  $\mu$ l, 100 mM Tris-HClバッファー (pH7.4) 800  $\mu$ l, 0.20 mM DPPH溶液 1 ml を添加し, 10秒間激しく攪拌した後, 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 (As) を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をコントロール (Ac) とした。また, 0.20 mM DPPH溶液の代わりにエタノール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 (Ac) に対する試料添加時の吸光度の減少割合 (Ac-As) をもとに, 以下の式 (1) によって阻害率 (%) を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

得られた阻害率を試料添加濃度に対してプロットすることにより, 試料と標準物質 (トロロックス) のIC<sub>50</sub> ( $\mu$ mol/ml) をそれぞれ求めた。続いて, 以下の式 (2) を用いて, 各試料のトロロックス等価活性 (TEAC) 値 ( $\mu$ mol TE/ $\mu$ mol) を算出した。

$$\text{TEAC } (\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}) = (\text{トロロックスのIC}_{50} (\mu\text{mol/ml})) / \text{抗酸化物のIC}_{50} (\mu\text{mol/ml}) \dots\dots\dots (2)$$

4. ABTSラジカル消去活性測定法 (ABTS法)

ABTS法による測定も, 既報と同様に行った<sup>11)</sup>。ABTS working solutionは, 7 mM ABTS溶液 5 ml, 140 mM ペルオキシ二硫酸カリウム溶液 88  $\mu$ l をよく混和し, 常温暗所に12~16時間放置した。さらに, この溶液の734 nmにおける吸光度が0.7  $\pm$  0.02となるように99.5%エタノールで希釈したものを使用した。試験管にABTS working solutionを 1 ml 加え, 100  $\mu$ l の試料溶液を添加後, 10秒間攪拌した。この溶液を30°Cで4分間インキュベーションした後, 734 nmにおける吸光度 (As) を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合

の吸光度をコントロール (Ac) とした。また, ABTS 溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。DPPH法と同様に各阻害率 (%) を上記式 (1) によって求め, さらにTEAC値 ( $\mu$ mol TE/ $\mu$ mol) を式 (2) により算出した。

5. FRAP法

FRAP法による測定は, DUDONNEらの方法に準じて行った<sup>13)</sup>。試料溶液100  $\mu$ l と超純水300  $\mu$ l をFRAP溶液 (0.3 M酢酸緩衝液 (pH3.6) : 10 mM TPTZ試薬 : 20 mM FeCl<sub>3</sub>試薬 = 10 : 1 : 1) 3 ml に添加し, 37°Cで30分間インキュベートした後, 593 nmでのサンプル吸光度を測定した。試料濃度 (x) に対して対応する吸光度の値 (y) をプロットし, 回帰直線を求めた。同様に標準物質であるトロロックスの回帰直線の傾きを求めた後, 各試料の回帰直線の傾きの値をトロロックス回帰直線の傾きの値で除し, TEAC値 ( $\mu$ mol TE/ $\mu$ mol) を算出した。

実験結果および考察

DPPHおよびABTS法を用いて, 合計21種類の抗酸化物 (Table 1) の抗酸化能を評価し, 得られたTEAC値をTable 2 に示した。なお, 用いた化合物は, フラボノイド系化合物としてフラボノール類とその配糖体6種 (ケンフェロール, ケルセチン, ミリセチン, モリン, ケルセチン 3-グルコシド, ルチン), フラボン類1種 (ルテオリン), フラバン-3-オール類4種 ((-)-エピカテキン (EC), (-)-エピガロカテキン (EGC), (-)-エピカテキンガレート (ECG), (-)-エピガロカテキンガレート (EGCG)) の計11化合物, およびその他化合物計10種 (*trans*-フェルラ酸, ピロカテコール, カフェ酸, 没食子酸, セサモール, エラグ酸, L-アスコルビン酸, L-システイン, グルタチオン, (+/-)- $\alpha$ -トコフェロール) である。

まず, 評価法毎に化合物の活性値を比較した。フラボノール類において, B環の水酸基の数が異なるケンフェロール, ケルセチン, ミリセチンのDPPH法での活性値を比較したところ, 活性値はケルセチン  $\approx$  ミリセチン > ケンフェロールの順となった。高い活性が認められたのは, 特にB環にカテコールおよびピロガロール構造を有する場合であった。一方, フラボノールのB環 2', 4' 位に水酸基を有するモリンの活性値は, 0.97  $\mu$ mol TE/ $\mu$ molとなりケンフェロールとほぼ同等であったことから, DPPH法での活性値にはB環の水酸基の数だけでなく, 水酸基の位置が重要な活性発現要因であることが示唆された。さらに, 活性発現に重要と考えられているフラボノールのC環 3 位の水酸基の影響を確認するため, C環 3 位に糖が結合したケルセチン 3-グルコシドおよびルチンの活性値をケルセチンと比較した。この糖の付加によりそれぞれ0.96および0.78  $\mu$ mol TE/ $\mu$ molの活性値低下が確認され, C環 3 位の水酸基が0.8~1.0  $\mu$ mol TE/ $\mu$ mol程度の抗酸化に寄与していることが示唆され

Table 1 Reference compounds

Sample	Substituent	Structures	
<i>Flavonols</i>			
Kaempferol	3, 4'-OH		
Quercetin	3, 3', 4'-OH		
Myricetin	3, 3', 4', 5'-OH		
Morin	3, 2', 4'-OH		
Quercetin 3-glucoside	3-rahamnose, 3', 4'-OH		
Rutin	3-rutinose, 3', 4'-OH		
<i>Flavons</i>			
Luteolin	3', 4'-OH		
<i>Flavan-3-ols</i>			
(-)-Epicatechin (EC)	3, 3', 4'-OH		
(-)-Epigallocatechin (EGC)	3, 3', 4', 5'-OH		
(-)-Epicatechin gallate (ECG)	3-gallic acid, 3', 4'-OH		
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	3-gallic acid, 3', 4', 5'-OH		
<i>Others</i>			
<i>trans</i> -Ferulic Acid		Ellagic Acid	
Pyrocatechol		L-Ascorbic Acid	
Caffeic Acid		L-Cysteine	
Gallic Acid		Glutathione	
Sesamol		(+/-)- $\alpha$ -Tocopherol	

た。同様のことがC環3位に水酸基を有さないフラボン類であるルテオリンの場合にも確認されたことから、フラボノイド類では、C環3位の水酸基の重要性が活性に重要であることが明らかとなった。フラボノイド類の構造と抗酸化能の関連性については、美甘らによっても報告されている<sup>14)</sup>。評価に用いられているのは、 $\beta$ -カロテン-リノール酸系の反応であり、DPPH法と反応メカニズムが異なるが、フラボノイドB環カテコール構造とC環3位に水酸基の重要性が特に強調されている点では本研究結果と一致していた。さらに、*in vivo*抗酸化活性試験法である細胞抗酸化活性測定法(CAA法)を用いた測定においても、フラボノイドB環カテコール構造の反

応性が高いことが指摘されており<sup>15)</sup>、カテコール構造は様々な抗酸化反応系で高い抗力を発揮する可能性を有することが示唆された。

フラバン-3-オール類であるカテキン類では、今回供試したカテキン類は総じて高い活性(3.12~4.86  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ )を示した。これらのことから、カテキン類においても上述のフラボノール類の結果と同様にB環カテコール・ピロガロール構造に起因すると推察された。さらにC環3位に没食子酸が結合したガレート型カテキンのECGおよびEGCGの活性値はそれぞれ4.86, 4.83  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ であり、他のカテキン類と比較して1.47~1.74  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ 高い値を示した。この結果は、C

Table 2 Antioxidant activity of compounds as determined by DPPH and ABTS

Sample	DPPH ( $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ )
<i>Flavonols</i>		
Kaempferol <sup>c</sup>	1.01 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
Quercetin <sup>b</sup>	3.18 $\pm$ 0.03	2.01 $\pm$ 0.09
Myricetin <sup>c</sup>	3.09 $\pm$ 0.11	3.11 $\pm$ 0.19
Morin <sup>c</sup>	0.97 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.12
Quercetin 3-glucoside <sup>b</sup>	2.22 $\pm$ 0.11	0.96 $\pm$ 0.04
Rutin <sup>b</sup>	2.40 $\pm$ 0.11	0.98 $\pm$ 0.04
<i>Flavon</i>		
Luteolin <sup>b</sup>	2.22 $\pm$ 0.07	1.04 $\pm$ 0.26
<i>Flavan-3-ols</i>		
(-)-Epicatechin (EC) <sup>b</sup>	2.73 $\pm$ 0.08	1.57 $\pm$ 0.08
(-)-Epigallocatechin (EGC) <sup>c</sup>	3.12 $\pm$ 0.05	2.98 $\pm$ 0.06
(-)-Epicatechin gallate (ECG) <sup>b</sup>	4.86 $\pm$ 0.21	3.11 $\pm$ 0.13
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) <sup>c</sup>	4.83 $\pm$ 0.18	4.67 $\pm$ 0.08
<i>Others</i>		
<i>trans</i> -Ferulic Acid <sup>c</sup>	0.71 $\pm$ 0.04	0.64 $\pm$ 0.06
Pyrocatechol <sup>b</sup>	2.73 $\pm$ 0.09	1.08 $\pm$ 0.03
Caffeic Acid <sup>b</sup>	2.46 $\pm$ 0.01	1.08 $\pm$ 0.04
Gallic Acid <sup>c</sup>	2.52 $\pm$ 0.06	2.49 $\pm$ 0.20
Sesamol <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.02	2.03 $\pm$ 0.09
Ellagic Acid <sup>b</sup>	3.84 $\pm$ 0.30	2.74 $\pm$ 0.32
L-Ascorbic Acid <sup>c</sup>	0.87 $\pm$ 0.00	1.06 $\pm$ 0.04
L-Cysteine <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.01	1.37 $\pm$ 0.07
Glutathione <sup>c</sup>	0.70 $\pm$ 0.00	0.80 $\pm$ 0.04
(+/-)- $\alpha$ -Tocopherol <sup>c</sup>	0.90 $\pm$ 0.05	0.94 $\pm$ 0.01

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3).

<sup>a</sup>: DPPH < ABTS, <sup>b</sup>: DPPH = ABTS, <sup>c</sup>: DPPH > ABTS

環3位の没食子酸エステル構造がカテキン類において大きな活性発現要因となっていることを示唆している。今回供試したカテキン類はすべて緑茶に含まれるカテキン類であり、酸化防止剤として利用されているチャ抽出物の主成分である。チャ抽出物中には、ガレート型カテキン、特にEGCGが多く含まれると考えられることから、チャ抽出物は極めて有効な酸化防止剤であることが本結果からも明らかになった。

フラボノイド類以外の化合物について、2  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ 以上の高いTEAC値を示したのは、ピロカテコール、カフェ酸、没食子酸、エラグ酸であり、いずれも分子内にカテコールあるいはピロガロール構造を有する化合物であった。特に、分子内に2個のカテコール構造を有するエラグ酸では3.84  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ と極めて高い値を示した。この結果から、フラボノイド以外の化合物でも、分子内にカテコールあるいはピロガロール構造を有すれば高い抗酸化能を発現することが確認された。一方、抗酸化能をもつことで知られているL-アスコルビン酸、グルタチオン、(+/-)- $\alpha$ -トコフェロールなどの活性値は総じて1  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ 以下の値であり、ラジ

カル消去能の面ではフラボノイド系化合物よりも効果が小さいものと判断された。

ABTS法を用いた測定では、DPPHと類似した結果が認められたが、一部で明らかな相違点が認められた。すなわち、DPPH法ではカテコール構造とピロガロール構造の反応性はほぼ同程度であったのに対して、ABTS法での活性値はカテコール構造と比較してピロガロール構造の反応性が高かった。具体的には、ABTS法では、ケルセチン>ミリセチン、EGC>EC、EGCG>ECG、没食子酸>ピロカテコール・カフェ酸などの傾向が確認された。また、カテコール構造を有するケルセチン3-グルコシド、ルチン、ルテオリン、ピロカテコール、カフェ酸などの化合物がいずれも1  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ 程度の活性値しか示さなかったのも特徴的であった。

DPPH法とABTS法は、同じ測定原理に基づくラジカル消去活性測定法である。両者は類似した活性傾向を示すものと考えられており、30種類の水溶性植物抽出物を用いた抗酸化能測定試験では、DPPH法とABTS法の測定結果に高い相関があることも示されている<sup>13)</sup>。しかしながら、単一成分からなる抗酸化物を用いた試験結果で

は、一部異なる傾向が認められた。

DPPH法とABTS法の測定結果に一部異なる傾向が認められたことから、両測定法の活性値の関連性を詳細に検討した。上記21種類の抗酸化物について、DPPH法とABTS法の活性 (TEAC値) の相関を検討した結果、両者の相関係数は0.779であり、類似した傾向は認められるものの、全体的にプロットがばらついた結果となった (図は省略)。そこで、Table 2の結果を詳細に検証し、DPPH法とABTS法の活性値を比較した。その結果、DPPH法での活性値がABTS法の活性値より高いグループ (DPPH>ABTS)、DPPH法とABTS法の活性値が同程度であるグループ (DPPH=ABTS)、DPPH法での活性値がABTS法の活性値より低いグループ (DPPH<ABTS) の3グループに大別されることが判明した。21化合物のグループ分け結果は、Table 2の化合物名にアルファベットの肩文字で示すとともに、その結果をDPPH法とABTS法の活性相関図 (Fig.1) に示した。このグループ分けで特に興味深いのは、DPPH活性が高いDPPH>ABTS群の抗酸化物が、いずれも分子内にカテコール構造を有していることであった。一方、カテコール構造を有さない化合物群では、例外的にABTS活性が高いDPPH<ABTS群であったセサモールおよびL-システインの場合を除き、残りの化合物すべてが両法の活性値が同等 (DPPH=ABTS) であった。そこで、抗酸化物のカテコールの有無を考慮して、カテコール構造有り群 (DPPH>ABTS群) とカテコール構造無し群 (DPPH=ABTS群) に分けて、再度DPPH法とABTS法の活性値の相関を検討した (Fig.2)。その結果、カテコール構造無し群では、傾きが0.957となりほぼ原点を通る回帰直線が得られた ( $y=0.957x+0.064$ ,  $r=0.998$ )。一方、カテコール構造有り群でも傾き0.901と1に近い回帰直

線が得られた ( $y=0.901x-1.048$ ,  $r=0.966$ )。両直線を比較すると直線が正の方向にほぼ平行移動した形となり、その移動量はTEAC値でおよそ $1.3 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ であった。この結果、抗酸化物質の構造内にカテコール構造が存在する場合は、DPPH法ではABTS法と比較して活性値が上乘せされることが明らかとなった。DPPH法とABTS法の活性値の違いは主として、このカテコール構造の反応性の違いに起因することが示唆され、その反応性の差が活性値で約 $1.3 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ に相当することが確認された。抗酸化物中のカテコール構造は、ラジカル消去反応後に酸化型であるキノン構造に変化することにより反応が停止する。しかしながら、DPPH法では、ラジカル消去反応後に酸化型であるキノン構造に変化したのち、エタノールやメタノールのような極性溶媒存在下でキノン構造が還元されることによりカテコール構造が再生され、再びDPPHラジカルと反応することが報告されている<sup>16),17)</sup>。本研究において示されたDPPH法におけるカテコール構造の特異的反応性は、このカテコール構造の再生反応に起因している可能性が高いと推察された。一方、ABTS法ではDPPHと比較して短時間で反応が平衡化する傾向があるため、カテコール構造再生の影響が現れにくい可能性が推察された。

続いて、DPPH・ABTS両法での評価結果に、金属イオンの還元能がどの程度反映されているかを確認するため、両法の活性値をFRAP法の活性値 (Table 3) と比較し、その相関を検討した (Fig.3)。Fig.3に示したように、DPPH法とFRAP法の相関プロットでは、傾きがほぼ1である原点付近を通る回帰直線が得られた ( $y=1.007x-0.072$ ,  $r=0.939$ )。この結果は、DPPH法での活性値が鉄イオンに対する還元能を強く反映していることを示唆するものであった。一方、ABTS法とFRAP法

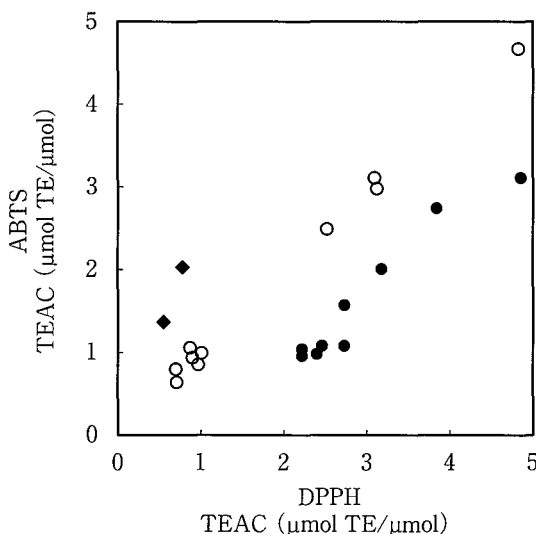


Fig. 1 Antioxidants and the correlation between DPPH and ABTS

◆ : DPPH < ABTS, ○ : DPPH = ABTS, ● : DPPH > ABTS (compounds with catechol structure)

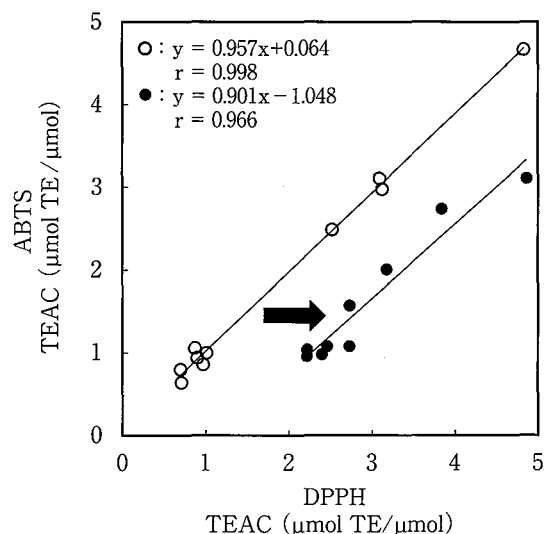


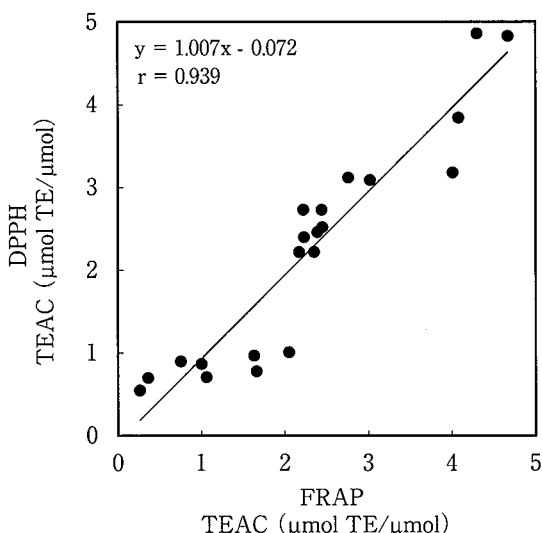
Fig. 2 The effect of catechol on the correlation between DPPH and ABTS

○ : without catechol structure (DPPH = ABTS),  
● : with catechol structure (DPPH > ABTS)

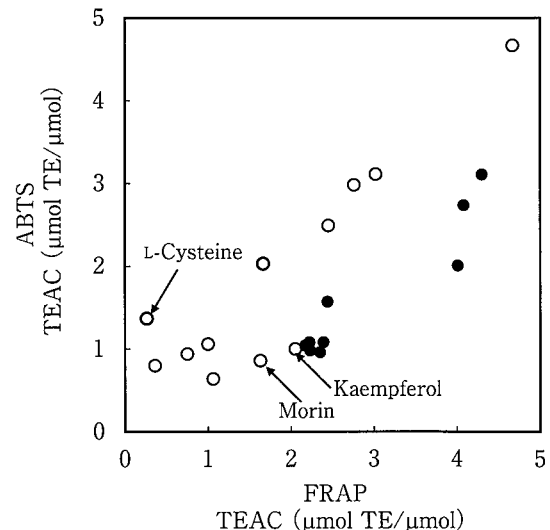
**Table 3** Antioxidant activity as determined by FRAP

Sample	FRAP ( $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ )
<i>Flavonols</i>	
Kaempferol	$2.05 \pm 0.04$
Quercetin	$4.01 \pm 0.11$
Myricetin	$3.02 \pm 0.12$
Morin	$1.63 \pm 0.02$
Quercetin 3-glucoside	$2.35 \pm 0.01$
Rutin	$2.23 \pm 0.11$
<i>Flavon</i>	
Luteolin	$2.17 \pm 0.02$
<i>Flavan-3-ols</i>	
(-)-Epicatechin (EC)	$2.44 \pm 0.05$
(-)-Epigallocatechin (EGC)	$2.76 \pm 0.07$
(-)-Epicatechin gallate (ECG)	$4.30 \pm 0.08$
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	$4.67 \pm 0.17$
<i>Others</i>	
<i>trans</i> -Ferulic Acid	$1.06 \pm 0.04$
Pyrocatechol	$2.22 \pm 0.09$
Caffeic Acid	$2.39 \pm 0.05$
Gallic Acid	$1.66 \pm 0.10$
Sesamol	$2.45 \pm 0.04$
Ellagic Acid	$4.08 \pm 0.01$
L-Ascorbic Acid	$1.00 \pm 0.00$
L-Cysteine	$0.26 \pm 0.00$
Glutathione	$0.36 \pm 0.12$
(+/-)- $\alpha$ -Tocopherol	$0.75 \pm 0.00$

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3)

**Fig. 3** Correlation between DPPH and FRAP

では、正の相関は認められたものの、DPPH法との相関と比較すると相関性が劣る結果となった ( $r=0.764$ ) (図は省略)。この原因を詳細に検討した結果、Fig. 4のABTS法とFRAP法の相関プロットに示したように、カ

**Fig. 4** Antioxidants and the correlation between ABTS and FRAP

○: without catechol structure, ●: with catechol structure

テコール構造を有する化合物群でFRAP法での活性値がABTS法の活性値より高くなる傾向が認められた。さらに、フラボノイドのB環に水酸基1つを持つケンフェロールおよびB環2', 4'位に水酸基を有するモリンでもFRAP法での活性値がABTS法の活性値より高い結果となった。なお、ケンフェロールとモリンについてはFRAP法での活性値がDPPH法の活性値より高い傾向も確認されており、FRAP法ではフラボノイドのB環がカテコールやピロガロール構造をとらなくても、単一の水酸基で高い反応性を示すことが示唆された。一方、L-システインは、FRAP法での活性値がABTS法の活性値より低い傾向を示した。分子内にチオール基を持つ化合物はFRAP法での鉄イオンとの反応が遅いことが報告されている<sup>18)</sup>。そのため、FRAP法でL-システインの活性値が低く見積もられていることがこの一因と考えられた。なお、上述のようにDPPH法でのL-システインの活性値はABTS法のものより低い傾向も確認されていることから、L-システインはABTSラジカルに対してのみ特異的に高い活性を示す可能性があることも示唆された。

以上の結果、DPPH法ではABTS法と比較して、その活性値に鉄イオンに対する還元能を強く反映していることが確認され、酸化防止剤の評価法としてより有力であることが明示された。現在、これらの結果を踏まえて、私たちの研究グループではDPPH法による複数研究機関での共同試験を実施し、試験結果の解析などに取り組み、酸化防止剤規格試験法(規格試験法)の確立を目指しているところである。

## 要 約

本研究では、既存添加物のうち、酸化防止剤に分類される品目の抗酸化能に基づく新たな規格基準の設定を最



終目的とし、その基礎となる評価法の設定に向けた検討を行った。酸化防止剤規格試験法候補として有力なDPPH法およびABTS法を用いて、21種類の抗酸化物の測定を行った結果、抗酸化物のカテコール・ピロガロール構造を中心として、それぞれの反応特性を明らかにした。さらに、両測定法の活性値の相関性を検証した結果、両法は概ね一致した活性傾向を示すものの、カテコール構造を有する化合物では、DPPH法がABTS法より約1.3  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ 高い活性値を示すことを明らかにした。また、両測定法をFRAP法と比較した結果、DPPH法がFRAP法と極めて高い相関を示すことを明らかにした。この結果は、DPPH法が金属イオンの還元能を強く反映していることを示している。この結果DPPH法が酸化防止剤の規格試験法候補として極めて有力であることが示唆された。

本研究は、平成23～25年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)により行われた。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省, 指定添加物リスト, 厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/>), 2013年8月8日更新
- 2) 厚生労働省, 既存添加物名簿収載品目リスト, 厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/>), 2013年2月7日更新
- 3) 石川洋哉・松本 清・受田浩之・島村智子・松藤 寛・山崎 壮: 食品の抗酸化能評価法, *FFI Journal*, **215**, 5~15 (2010)
- 4) WU, X., BEECHER, G. R., HOLDEN, J. M., HAYTOWITZ, D. B., GEBHARDT, S. E. and PRIOR, R. L.: Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4026~4037 (2004)
- 5) HIRANO, R., SASAMOTO, W., MATSUMOTO, A., ITAKURA, H., IGARASHI, O. and KONDO, K.: Antioxidant Ability of Various Flavonoids against DPPH Radicals and LDL Oxidation, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **47**, 357~362 (2001)
- 6) YAMAGUCHI, T., TAKAMURA, H., MATOBA, T. and TERAO, J.: HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1201~1204 (1998)
- 7) RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. and RICE-EVANS, C.: Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology & Medicine*, **26**, 1231~1237 (1999)
- 8) BENZIE, I. F. F. and STRAIN, J. J.: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, *Anal. Biochem.*, **239**, 70~76 (1996)
- 9) NODA, Y., ANZAL, K., MORI, A., KOHNO, M., SHINMEI, M. and PACKER, L.: Hydroxyl and Superoxide Anion Radical Scavenging Activities of Natural Source Antioxidants Using the Computerized JES-FR30 ESR Spectrometer System, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 35~44 (1997)
- 10) UKEDA, H., KAWANA, D., MAEDA, S. and SAWAMURA, M.: Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on the Reduction of Highly Water-soluble Tetrazolium Salts by Xanthine-Xanthine Oxidase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 485~488 (1999)
- 11) 島村智子・松浦理太郎・徳田貴志・杉本直樹・山崎 壮・松藤 寛・松井利郎・松本 清・受田浩之: 酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験, 日本食品科学工学会誌, **54**, 482~487 (2007)
- 12) 佐藤英輔・井上正康: 活性酸素, 日衛誌, **56**, 606~614 (2002)
- 13) DUDONNÉ, S., VITRAC, X., COUTIÈRE, P., WOILLET, M. and MÉRILLON, J.M.: Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1768~1774 (2009)
- 14) 美甘江利子・岡田安代・扇間昌規・伊藤誉志男・森本隆司・中村幹雄: フラボノイド類の抗酸化活性と構造との相関性に関する研究 (2), 日食化誌, **7**, 97~101 (2000)
- 15) WOLFE, K. L. and LIU, R. H.: Structure-Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 8404~8411 (2008)
- 16) SENTANDREU, E., NAVARRO, J. L. and SENDRA, J. M.: Reduction Kinetics of the Antiradical Probe 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl in Methanol and Acetonitrile by the Antiradical Activity of Protocatechuic Acid and Protocatechuic Acid Methyl Ester, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 4928~4936 (2008)
- 17) SENDRA, J. M., SENTANDREU, E. and NAVARRO, J. L.: Kinetic Model for the Antiradical Activity of the Isolated *p*-Catechol Group in Flavanone Type Structures Using the Free Stable Radical 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as the Antiradical Probe, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5512~5522 (2007)
- 18) BOXIN, O., DEJIAN, H., MAUREEN, H. W., JUDITH, A. F. and ELIZABETH, K. D.: Analysis of Antioxidant

Activities of Common Vegetables Employing  
Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and  
Ferric Reducing antioxidant Power (FRAP)

Assays : A Comparative Study, *J. Agric. Food  
Chem.*, **50**, 3122~3128 (2002)

(平成25年10月17日受付, 平成26年1月20日受理)

---