各種抗酸化剤作用力測定法の比較

Comparison of various methods for the determination of antioxidant activity

(昭和 30 年 12 月 1 日受理)

福 場 博 保 小 池 弘 子 稲 垣 長 典
(Hiroyasu Fukuba) (Hiroko Koike) (Chôten Inagaki)

緒 言

近年多くの抗酸化剤が発見され、又合成されてきたが、その抗酸化能についての多数の報告は、報告者によつて実験条件や、基質の種類が異なるため時としては全く相反した結果となつてゐることすらある。

現在這一般に用いられている方法の中、常温放置による過酸化物質の上昇を測定する方法、Active Oxygen Method (A. O. M.), Lipoxidase 法、及び Thiobarbituric acid (T. B. A.) 法の 4 方法を用いて抗酸化剤の作用力を測定し、此等 4 種の測定結果に平行関係が見出せるかどうか、又どのような方法による時、最も迅速正確に抗酸化力を求め得るかを実験した。

実 験 の 部

1. 基質：大豆油より分離した混合脂肪酸
2. 抗酸化剤：Hydroquinone, N. D. G. A., Propyl gallate, Octyl gallate, Dodecyl gallate, Butylated hydroxyanisole (B. H. A.), α -tocopherol、及び 2, 6-di-*tert*-butyl-4-methyl phenol (D. B. M. P.) の 8 種を用いた。
3. Synergist：クエン酸を用いた。

I. 常温放置実験

混合脂肪酸 20 cc. に抗酸化剤のアルコール溶液を終濃度 0.1% 及び 0.01% になるように添加し、更に synergist の影響を試験するものについては、クエン酸の 0.025% アルコール溶液を 1 cc. 加え、試料を 30 cc. 容の同径の秤量管に容れ、室温に放置し、1 週間毎にこのなかから 3 cc. を採取し、常法によつて過酸化物質 (Po. V.) を測定し、油脂の酸化誘導期を求めた。

II. A. O. M.⁽¹⁾

常温放置実験と同様に混合脂肪酸 20 cc. に抗酸化剤を終濃度 0.1% 及び 0.01% になるように添加し、更にクエン酸を 0.025% になるように添加する。このものを A. O. M. 用の測定管に容れ、98°C に保ちながら、これに洗滌した空気を一定速度で吹き込んで酸化を促進させ、3 時間毎に試料 3 cc. を採り、Po. V. を測定した。

III. Lipoxidase に対する阻害反応より抗酸化剤の効

力を判定する方法⁽²⁾

大豆から分離した混合脂肪酸に Sørensen の磷酸緩衝液 (pH 6.8) を加え、5% 溶液とし、更に終濃度で 1 % になるように Tween 40 を加えて乳化させたものを基質として使用し、酵素液としては、低温脱脂大豆粉より磷酸緩衝液を用いて抽出した抽出液を用いた。以上の質基 2 cc, 酵素液 0.5 cc, 抗酸化剤 0.1 cc, クエン酸 0.1cc. を混合し、対照実験については、50% アルコールを 0.2 cc 添加したものを使用し、Warburg の検圧計を用い、30°C にて 30 分間に於ける酸素吸収を測定した。

IV) T. B. A. 反応⁽³⁾

常温放置実験と全く同一に試料を調製し、30 cc. 容の秤量管を用いて 32°C の恒温器中にて放置する。このものから 24 時間毎に 1 cc. を採り、Kohn 及び Liver-sedge の方法によつて調製した T. B. A. 試薬 5 cc. に加え、100°C に 10 分間加熱した後、直ちに冷却し、30 分後にその水層を採取して 530 m μ に於ける吸光値を測定した。

実 験 結 果

I) 常温放置実験

42 日まで Po. V. を求めたが、42 日後に於ける抗酸化剤無添加のものの Po. V. が 15 であり、誘導期から酸化期への転移点を正確にとらえることは出来なかつたが、Po. V. 5.0 に達する迄の日数をグラフより求めてみると、第 1 表となる。

第 1 表 過酸化物質 5.0 に達する迄の日数

抗 酸 化 剤 濃 度	0.1%	0.01%
Control	18	
Hydroquinone	—	25.5
N. D. G. A.	—	24.5
α -tocopherol	26	17
B. H. A.	26	14
D. B. M. P.	22	15
Propyl gallate	38	19
Octyl gallate	30	19
Dodecyl gallate	30	11

以上の結果より N. D. G. A. 及び Hydroquinone が他の抗酸化剤以上に抗酸化力を持つものと考えられる。

II) A. O. M.

抗酸化剤を添加しないで、高温酸化させた時の酸化曲線を Po. V. によつて求めると第1図となり、約2時間で Po. V. は最高値に達することを知らることが出来た。又これに 0.1% 及び 0.01% になるように抗酸化剤を添加した時の酸化曲線は各第2図及び第3図となり、0.1% 添加では α -tocopherol の抗酸化性が最も弱く、gallate 類の抗酸化性が強く出て来たが、0.01% 添加では逆に gallate 類の抗酸化性が最も弱い結果となり、tocopherol の方は濃度による作用力の変化が少く、0.1% の際とほぼ同様な酸化曲線となった。

第1図 AOM 酸化曲線

第2図 0.1% 各種抗酸化剤を添加した時の AOM 酸化曲線

第3図 0.01% 各種抗酸化剤を添加した時の AOM 酸化曲線

III) リボキシダーゼによる方法

抗酸化剤の中には水に不溶性のものもあるので、溶媒としてアルコールを用いたが、アルコールのリボキシダーゼ活性に対する影響について検討し 50% 以下のアルコール溶液を用いて抗酸化剤を溶解しても、このアルコールがリボキシダーゼ活性には何ら影響しないことを知り得たので全実験にこの濃度のアルコールを使用した。

第4図 抗酸化剤の濃度によるリボキシダーゼ阻害力変化

先ず抗酸化剤の濃度による阻害反応の変化について検討し第4図及び第5図を得た。又各種抗酸化剤を M/10 溶液及び M/100 溶液とし反応後に添加した時の阻害曲線は第6図及び第7図である。但し N. D. G. A. 及び dodecyl gallate は共に溶解度の関係より M/100 以上の濃度の溶液について実験することが出来なかつた。こ

第5図 抗酸化剤の濃度によるリポキシダーゼ阻害力変化

第6図 各種抗酸化剤の抗酸化力比較 (M/10)

第7図 各種抗酸化剤の抗酸化力比較(M/100)

れらの結果, hydroquinone, propyl gallate, octyl gallate に特に強力な阻害反応を認めることが出来た。

IV) T. B. A. 反応

抗酸化剤無添加の場合, T. B. A. 反応による吸光値の最大は上述の実験方法によつて第3日目にあらわれて来る, 又抗酸化剤添加の場合にもほぼ同様に3日目にピークが認められた。ただ本法による時には, 抗酸化剤の種類によつては発色時に白濁を生ずるものもあり, この為 control より高い値となるものもあつた。クエン酸を添加した場合, 及び添加しない場合, について抗酸化剤濃度 0.1% 及び 0.01%, 放置期間3日のものの比色値を総括して表とすると第2表となる。

第2表 T. B. A. 反応による抗酸化力比較

抗 酸 化 剤	濃 度			
	0.1%		0.01%	
	I	II	I	II
N. D. G. A.	0.155	0.125	0.208	0.183
α -tocopherol	0.207	0.124	0.325	0.068
B. H. A.	0.107	0.101	0.688	0.090
D. B. M. P.	0.136	0.047	0.146	0.055
hydroquinone	0.122	0.090	0.141	0.083
propyl gallate	0.108	0.057	0.208	0.139
octyl gallate	0.225	0.175	0.120	0.113
dodecyl gallate	0.124	0.075	0.139	0.063
Control	0.200			

I : クエン酸無添加 II : クエン酸添加

考 察

常温放置実験では 0.1%, 0.01% の両実験に於いて, hydroquinone 及び N. D. G. A. に強力な抗酸化力が認められ, propyl gallate, octyl gallate, α -tocopherol がこれに次いでいる。この実験では, 濃度による抗酸化力順序に大きな変化は認められなかったが, A. O. M. 実験では, 0.1% 添加では gallate 類が強い抗酸化力を示したのに反し, 0.01% 添加では逆に使用した抗酸化剤中では gallate 類の抗酸化力が最も弱い結果となっている。これらの結果は恐らく, gallate 類がある濃度以上含まれた時に最も有効に抗酸化力を現すものと考えられる。尙本実験に於いて N. D. G. A. に対するクエン酸の協同作用がはつきりとあらわれているが, クエン酸はその他の抗酸化剤に対してはそれ程有効とも思われない。

以上と全く原理を異にした, リポキシダーゼによる抗酸化力測定をみると, 本法は測定時間が短時間ですむ長所を持つているが, 一般に抗酸化剤は水に対して難溶性のものが多く, この点が本法に対して測定上不便な点となっている。各種抗酸化剤の効果は高濃度殊に M/10 に於いて最もはつきりと判定出来, hydroquinone, propyl gallate, octyl gallate 等に強い抗酸化性を認めることが出来た, 然し, N. D. G. A. 等のような 50% アルコールも難溶性の化合物には本法は不適当である。

又最近多く用いられている T. B. A. 法は油脂酸化の初期段階を測定するのに便利であると言われているが, 抗酸化剤の測定方法としては種々の欠点をもち, 抗酸化剤の種類によつては, 比色後が白濁して十分成果を挙げることが出来ず, 又クエン酸を添加して, この有機酸の協同作用を求めようとする時には, クエン酸と T. B. A. との反応によつて比色後の色度が低くなり, 抗酸化剤を

添加しないものについても, クエン酸添加によつて低い呈色値しか得られなかった。

以上のような点より, 使用した四つの実験方法では, A. O. M. が最もすぐれた抗酸化力測定方法と考えられる。

本実験を行うに当り種々御援助頂きました東京大学農学部, 田村三郎助教授に感謝します。

(本研究は昭和 30 年 4 月京都で行われた栄養食糧学会の大会にて講演したものである。)

結 論

1. 常温放置法, A. O. M. lipoxidase に対する阻害率, 及び T. B. A. 反応の四者によつて各種抗酸化剤の抗酸化力を求めた。
2. 本実験によりこれら 4 法中 A. O. M. が抗酸化剤の作用力測定法として最もすぐれたものと考えられる。
3. クエン酸の抗酸化剤に対する協同作用は, 天然油脂より分離した混合脂肪酸を基質とした時には殆んど認められなかった。
4. B. H. A. はこのものの単独ではその抗酸化力は弱いもので, gallate 等と混合した時にはじめて強力な抗酸化性を示す。

文 献

- 1) 田村三郎: 化学の領域: 7 (1953).
- 2) 福場博保: 栄養と食糧, 4 (1952).
- 3) 稲垣長典, 多羅尾圭子, 藤巻正生: 農化; 28, 967 (1954).

(お茶の水女大栄養化学)

米 蛋 白 質 の 抽 出

米蛋白質は普通の溶剤では不溶でありこのものの研究の一障害となつて来たが, 著者は alkyl aryl-sulfonate 系のアニオン性界面活性剤を応用して蛋白質の抽出について研究を行った。著者の実験によると, 100 メッシュに粉碎した米粉を用い抽出剤として 4% Santomerse No. 3, 2% sodium carbonate, 及び 0.2% sodium

bisulfite を用いると 2~9 時間で抽出を終ることが出来る。

Extraction of Rice Proteins. by R. T. McIntyre and K. Kymal. *Cereal Chem.*, 33, 38~44 (1956)

(福 場)