抗酸化能測定法である H-ORAC 法の室間共同試験

渡辺 純[§], 沖 智之^{*1}, 竹林 純^{*2}, 山崎光司^{*3}, 津志田藤二郎^{*4}

独立行政法人農業食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所

^{*1} 独立行政法人農業食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター

^{*2} 独立行政法人国立健康・栄養研究所

^{*3} 太陽化学株式会社

^{*4} 宮城大学食産業学部

Interlaboratory Study of Hydrophilic-Oxygen Radical Absorbance Capacity, a Method for Measuring Antioxidant Capacity

Jun Watanabe[§], Tomoyuki Oki^{*1}, Jun Takebayashi^{*2}, Koji Yamasaki^{*3} and Tojiro Tsushida^{*4}

National Agriculture and Food Research Organization, National Food Research Institute,
2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

^{*1} National Agriculture and Food Research Organization, National Agricultural Research Center
for Kyushu Okinawa Region, 2421, Suya, Koshi, Kumamoto 861-1192

^{*2} National Institute of Health and Nutrition, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8636

^{*3} Taiyo Kagaku Co., Ltd., 1-3, Takara-cho, Yokkaichi, Mie 510-0844

^{*4} Miyagi University, 2-2-1, Hatatate, Taihaku-ku, Sendai, Miyagi 982-0215

In this study, we performed an interlaboratory study of the H-ORAC method (hydrophilic-oxygen radical absorbance capacity), which is an antioxidant potential measuring method using representative antioxidant components, on the basis of the guideline of AOAC International and investigated the accuracy. Eleven laboratories participated, and analyzed five representative antioxidative compounds ((+)-catechin, Trolox, *trans*-ferulic acid, hesperetin, and caffeic acid) in solution and in powder as blind duplicates. A statistical treatment revealed that the relative standard deviation of repeatability (RSD_r) of material solutions ranged from 5.9% to 13.2%, and from 5.4 to 10.4% in powder sample. The interlaboratory relative standard deviation of reproducibility (RSD_R) of material solutions or powders ranged from 16.2% to 61.4%, from 16.9% to 33.2%, respectively. The HorRat values of material solutions or powders calculated from the highest concentration of Trolox standard curve (50 μM) ranged from 1.48 to 5.62 in solution example, from 1.54 to 3.03 in powder example, respectively. Thus, it is difficult to conclude that H-ORAC method used in the present interlaboratory study has acceptable precision. It is suggested that the individualities of plate readers cause the differences in the change of fluorescence intensity among the wells of the microplate, and that reduction of such differences induces improvement in the reproducibility.

(Received Jul. 28, 2010 ; Accepted Aug. 20, 2010)

Keywords : H-ORAC, antioxidant capacity, interlaboratory study

キーワード : H-ORAC 法, 抗酸化能, 室間共同試験

我々ヒトをはじめとする好気性生物は、酸素を利用して効率よいエネルギー代謝を行っている。呼吸により取り込まれた酸素の大部分はエネルギー産生に用いられるが、平常時でもそのうちの数%は活性酸素種に変換されることが

知られている¹⁾。活性酸素種は生体防御で積極的に利用されているが、一方では活性酸素種が種々の疾病の発症や老化に関与することもよく知られている。高い反応性を有する活性酸素種がタンパク質、脂質や DNA などの生体成分を酸化して、タンパク質の変性、脂質の過酸化、遺伝子の損傷を引き起こすことが疾病発症の原因だと考えられている。

野菜・果物などの食品中には活性酸素種を消去することで生体成分の酸化を防ぐポリフェノールなどの種々の抗酸

〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

^{*1} 〒861-1192 熊本県合志市須屋 2421

^{*2} 〒162-8636 東京都新宿区戸山 1-23-1

^{*3} 〒510-0844 三重県四日市市宝町 1-3

^{*4} 〒982-0215 宮城県太白区旗立 2-2-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), nabej@affrc.go.jp

化物質が豊富に含まれている。米国においては、生活習慣病予防に関わると考えられる食品のもつ抗酸化能に着目して、277 品目の果実・野菜等の抗酸化能を ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 法により測定し、農務省のホームページで公開している¹⁾。一方、我が国においては食品の抗酸化機能性に関する長い研究の歴史があり、これまでに多種多様な抗酸化能測定法が用いられてきたという背景があるため、測定法の統一と標準化が必要と考えられている。2007 年に設立された AOU 研究会では、ORAC 法を抗酸化能測定における標準法の有力候補として選定している¹¹⁾。

抗酸化能測定法は、HAT (hydrogen atom transfer: 水素原子供与) 反応あるいは ET (electron transfer: 電子供与) 反応を反応機構とする 2 つのタイプに大別される²⁾。HAT 反応に基づく測定法の大多数は、アゾ化合物の熱分解により生じるペルオキシラジカルとの競合的な反応様式によるもので、ORAC 法³⁾、TRAP (total radical-trapping antioxidant potential) 法⁴⁾ が代表的である。ET 反応に基づく測定法では、DPPH 法⁵⁾、Folin-Ciocalteu 試薬による総フェノール測定⁶⁾、TEAC (Trolox equivalence antioxidant capacity) 法⁷⁾ などが代表的である。ORAC 法は AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) から誘導されるペルオキシラジカルにより蛍光プローブであるフルオレセインが分解されて蛍光を失う過程の抑制を評価し、試料の抗酸化能を Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 当量で表す³⁾。ORAC 法は天然に存在しない安定ラジカルを用いるのではなく、生体成分の過酸化反応に関与する脂質ペルオキシラジカルを模したラジカル種を用い、水系において生理的 pH で反応を行うため、生体での酸化反応に近い評価系であると考えられている⁸⁾。ORAC 法は水系溶媒中での反応であることから、親水性抗酸化物質に起因する抗酸化能のみが評価対象となっていたが、メチル化 β -シクロデキストリンを可溶化剤として添加することにより α -トコフェロールをはじめとする親油性抗酸化物質にも適用する方法が開発されている⁸⁾。一方で、野菜や果実など多くの食品では、ポリフェノール類などを含む親水性部の抗酸化能への寄与が親油性部より大きいことから⁹⁾、まず親水性部の ORAC 測定 (hydrophilic-ORAC, H-ORAC) 法に着目した。

現在、食品の分析法においては、妥当性が確認された方法を採用することが一般的である¹⁰⁾¹¹⁾。分析法の妥当性確認においては、測定の手順、使用装置の性能、試薬等を定めた手順書に従い、複数の試験室が均質の試料を測定したときの測定値のばらつきの程度を併行精度や室間再現性といった統計的パラメータで評価する室間共同試験が必要である。抗酸化能評価法としては、DPPH 法、TRAP 法、WST-1 法に関して既存添加物の抗酸化能評価の公定法化

を目指して 3 機関による予備的な室間共同試験が行われているが¹²⁾、試料数 5 以上、試験室数 8 以上と定めた AOAC International の基準¹³⁾を満たした室間共同試験実施の報告はない。本研究では、抗酸化能測定法として H-ORAC 法に注目し、AOAC International の基準¹³⁾に基づき、代表的な抗酸化物質を用いて室間共同試験を行い、精度の調査を行った。

実 験 方 法

1. 測定方法

H-ORAC の測定は Prior らの方法¹⁴⁾を一部改変した方法を用い、以下のように行った。改変した点は、試料のプレート内での配置を点対称に 2 反復とした点であり (Fig. 1)、基本的には原法に準じた。抗酸化物質溶液試料の場合は、試料を 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で適宜希釈し、測定に供した。抗酸化物質粉末試料の場合は、AWA 溶液 (アセトン: 水: 酢酸 70: 29.5: 0.5) で 100 mg/100 mL の濃度に調製した後、75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で適宜希釈し、測定に供した。希釈した試料溶液あるいは Trolox 溶液 (6.25, 12.5, 25, 50 μ M/75 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.4, Aldrich) を 96 穴マイクロプレート (#3072, Becton Dickinson) に 20 μ L 入れ、さらにフルオレセイン溶液 (94.4 nM/75 mM リン酸緩衝液 pH 7.4, Sigma) を 200 μ L 加え、37°C に保った蛍光プレートリーダーを用い、フルオレセインの蛍光強度を測定した。その後、AAPH 溶液 (31.7 mM/75 mM リン酸緩衝液 pH 7.4) を 75 μ L 加えて振とう攪拌後、添加 8 分後から 2 分間隔で 90 分間蛍光強度の経時変化を測定した。フルオレセインの蛍光強度測定はマイクロプレート底面からの測光を推奨したが、上部からの測定でも可能とした。蛍光強度を経時的に記録したグラフの曲線下面積 (AUC) を算出し、ブランクの AUC を差し引いた値 (net AUC) を求めた。Trolox 標準液の濃度を横軸に、その net AUC を縦軸にとり二次近似した検量線を用い、希釈した試料の H-ORAC 値を Trolox 相当量 (TE) として表した。試料の希釈は検量線範囲内に少なくとも 1 点の希釈倍率が入る任意の 4 段階とし、複数の希釈倍率から H-ORAC 値が計算可能な場合は、それらの平均値を試料の H-ORAC 値とした。

2. 室間共同試験

参加試験室は 11 である (大阪市立大学, (財)食品分析開発センター SUNATEC, (財)日本食品分析センター名古屋支所, 同彩都研究所, (独)国立健康・栄養研究所, (独)農研機構 九州・沖縄農業研究センター, 同畜産草地研究所, 同野菜茶業研究所, 同果樹研究所, カゴメ (株) 分析センター, アサヒビール (株))。参加試験室には試料の測定方法やデータの取り扱いなどを記した分析手順書を配付し、これに従って各機関が試料の H-ORAC を測定した。

	Blank	Trolox standard solution (μM)				Trolox standard solution (μM)				Blank	
		50	25	12.5	6.25	6.25	12.5	25	50		
	#1	#2	#3	#4	#5	#5	#4	#3	#2	#1	
		Lower dilution					Higher dilution				
			↓					↑			
		Higher dilution					Lower dilution				
	Blank	Trolox standard solution (μM)				Trolox standard solution (μM)				Blank	
		50	25	12.5	6.25	6.25	12.5	25	50		

Fig. 1 Plate layout for H-ORAC measurement

Trolox standard solutions and diluted material solutions (4 different dilutions) were added to the wells of 96-well microplate in accordance with this layout.

H-ORAC 測定に用いたプレートリーダーは、試験室 A, B が Powerscan HT (DS フェーマバイオメディカル)、試験室 C が Synergy HT (Biotek)、試験室 D, E が Wallac ARVO SX 1420 (Perkin Elmer)、試験室 F, G が Spectra-Max M2e (Molecular Devices)、試験室 H が MTP-650 FA (コロナ電気)、試験室 I が MTP-800 (コロナ電気)、試験室 J が SPECTRA Fluor Plus (TECAN)、試験室 K が Vario Scan (Thermo Labsystems) である。フルオレセインおよび AAPH 溶液の分注は、試験室 A, B, C, D, K がプレートリーダー付属の自動分注装置を用い、それ以外の試験室は 12 連マイクロピペッターを用いた。フルオレセインの蛍光強度測定は、試験室 A, B, C, F, G, J がプレート底面から、それら以外の試験室はプレート上部からの測光方式を用いた。

3. 室間共同試験用試料

分析試料として、5 種の抗酸化物質 ((+)-カテキン (Alexis), *trans*-フェルラ酸, カフェイン酸, ヘスペレチン (東京化成工業), Trolox (Aldrich)) を粉末および溶液試料として配付した。なお、溶液試料には、各抗酸化物質を 1 g/L となるように AWA 溶液に溶解し、これを 10.0 mg/L となるように 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で希釈した溶液を用いた。調製した抗酸化物質の溶液および抗酸化物質の粉末は、よく混合した後にガラス容器に小分けして密栓し、試料に乱数による番号を付与して、非明示の各試料を 2 反復分、11 試験室に配付した。試料の配付は -20°C で行い、到着した試料は各試験室で測定まで -20°C 以下で保存した。

4. 統計処理

集計データの棄却と解析は、測定値の分散を比較する Cochran 検定、試験室間の平均値を比較する Grubbs 検定

を行い、国際プロトコルに従って参加試験室の 2/9 以上は棄却しないようにして、解析に使用するデータを選別した¹³⁾¹⁵⁾。試料ごとに Microsoft Excel (Microsoft) で分散分析を行い、さらに併行標準偏差 (S_r)、室内再現相対標準偏差 (RSD_r)、室間再現標準偏差 (S_R) および室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を求めた。検量線上限の Trolox 濃度である $50\mu\text{M}$ から理論的な室間再現相対標準偏差 ($PRSD_R$) を計算し¹⁶⁾、HorRat¹⁷⁾ を求めた。

実 験 結 果

1. 溶液試料

各試験室の各試料の H-ORAC 値を Table 1 に示す。すべての試料で Cochran 検定および Grubbs 検定で外れ値は検出されなかったため、全試験室のデータを用いて解析した。分析試料として配付した Trolox 溶液の H-ORAC 値の理論値は $38.8\mu\text{mol TE/L}$ であり、11 試験室の測定値の平均値の理論値からの偏りは 0.3% であった。 RSD_r は 5.9~13.2%, RSD_R は 16.2~61.4% であった。HorRat 値は 1.48~5.62 であった (Table 2)。

2. 粉末試料

各試験室の各試料の H-ORAC 値を Table 3 に示す。試験室 F の *trans*-フェルラ酸の測定値が Grubbs 検定の結果棄却された。棄却済みデータを用いた解析結果を Table 4 に示す。分析試料として配付した Trolox の H-ORAC 値の理論値は $3876\mu\text{mol TE/g}$ であり、11 試験室の測定値の平均値の理論値からの偏りは 1.9% であった。 RSD_r は 5.4~10.4%。 RSD_R は 16.9~33.2% であった。HorRat 値は 1.54~3.03 であった (Table 4)。

Table 1 Result of H-ORAC values ($\mu\text{mol TE/L}$) of five antioxidant solutions for the interlaboratory study

Laboratory	(+) -catechin		Trolox		<i>trans</i> -ferulic acid		hesperetin		caffeic acid	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
A	316	377	33	34	169	173	157	138	257	244
B	475	495	39	43	203	194	96	88	300	310
C	330	332	29	29	155	166	67	55	248	223
D	477	556	40	43	192	183	83	82	265	312
E	516	365	42	41	202	212	218	219	304	311
F	645	427	46	42	196	227	164	168	357	329
G	612	633	41	40	221	223	159	214	319	304
H	542	600	39	42	194	187	133	121	336	329
I	563	630	35	36	182	171	182	175	338	342
J	408	415	39	43	176	181	88	118	239	257
K	463	494	44	36	222	177	181	158	328	281

Table 2 Interlaboratory study results for determination of H-ORAC value of five antioxidant solutions

Material	(+) -catechin	Trolox	<i>trans</i> -ferulic acid	hesperetin	caffeic acid
Number of laboratories ^{a)}	11 (0)	11 (0)	11 (0)	11 (0)	11 (0)
Mean ($\mu\text{mol TE/L}$)	485	38.9	191	139	297
S_r ($\mu\text{mol TE/L}$)	64.0	2.59	12.8	15.4	17.5
r ($\mu\text{mol TE/L}$) ^{b)}	179	7.25	35.8	43.3	49.0
RSD_r (%)	13.2	6.66	6.69	11.1	5.89
S_R ($\mu\text{mol TE/L}$)	160	7.28	31.0	85.6	63.7
R ($\mu\text{mol TE/L}$) ^{c)}	449	20.4	86.8	240	179
RSD_R (%)	33.1	18.7	16.2	61.4	21.5
HorRat ^{d)}	3.02	1.71	1.48	5.62	1.96

^{a)} Retained after outlier laboratories removed, and number of outlier laboratories in parentheses ;

^{b)} $r = 2.8 \times S_r$; ^{c)} $R = 2.8 \times S_R$; ^{d)} HorRat value = $RSD_R / \text{predicted } RSD_R$

Table 3 Result of H-ORAC values ($\mu\text{mol TE/g}$) of five antioxidant powders for the interlaboratory study

Laboratory	(+) -catechin		Trolox		<i>trans</i> -ferulic acid		hesperetin		caffeic acid	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
A	38367	38089	3692	3764	17958	18455	18844	20565	26259	28492
B	50520	50858	4112	3910	20612	21090	20505	21222	31986	33176
C	39852	40983	3177	3187	15552	16760	17238	16934	24857	24994
D	59823	51975	3607	4335	18516	19620	18310	22538	31199	22126
E	52313	48103	4214	4336	21316	20118	25534	24012	32360	28646
F	58661	67815	5454	4369	27570 ^{a)}	26200 ^{a)}	29314	26391	42351	44392
G	62850	64402	3772	4261	20298	20785	20771	22072	32503	37757
H	54248	51185	3779	3847	18458	18551	17227	17834	29821	30824
I	52303	51927	4999	4120	21414	19226	21859	17966	32463	31890
J	47001	46313	3241	3220	16274	19223	19594	15573	32222	30616
K	43988	44160	3601	3891	14884	16435	21968	16010	22237	18701

^{a)} Outlier laboratory on the basis of Grubbs test

考 察

本研究では、AOAC International の基準¹³⁾に基づき、代表的な抗酸化物質を用いて抗酸化能測定法である

H-ORAC 法の試験室間共同試験を行い、精度の調査を行った。今回の室間共同試験に用いた分析手順書は、Prior らの方法¹⁴⁾を基に作成した。作成した分析手順書に従い、5 種の抗酸化物質溶液を用いて 1 日 2 反復の測定を 5 日間

Table 4 Interlaboratory study results for determination of H-ORAC value of five antioxidant powders

Material	(+)-catechin	Trolox	<i>trans</i> -ferulic acid	hesperetin	caffeic acid
Number of laboratories ^{a)}	11 (0)	11 (0)	10 (1)	11 (0)	11 (0)
Mean ($\mu\text{mol TE/g}$)	50715	3949	18777	20558	30449
S_r ($\mu\text{mol TE/g}$)	2837	361.1	1018	2145	2617
r ($\mu\text{mol TE/g}$) ^{b)}	7943	1011	2850	6005	7329
RSD_r (%)	5.59	9.14	5.42	10.4	8.60
S_R ($\mu\text{mol TE/g}$)	14132	850.4	3170	5418	10098
R ($\mu\text{mol TE/g}$) ^{c)}	39570	2381	8875	15170	28273
RSD_R (%)	27.9	21.5	16.9	26.4	33.2
HorRat ^{d)}	2.55	1.97	1.54	2.41	3.03

^{a)} Retained after outlier laboratories removed, and number of outlier laboratories in parentheses ;

^{b)} $r = 2.8 \times S_r$; ^{c)} $R = 2.8 \times S_R$; ^{d)} HorRat value = $RSD_R / \text{predicted } RSD_R$

行い、中間精度が3.9～7.7%の範囲であることを確認した後、室間共同試験を実施した。

食品分析の分野においては、化学分析法によって得られた測定値のばらつきの判断基準として Horwitz の式が広く用いられており、 RSD_R と $PRSD_R$ の比率である HorRat が、 $0.5 < \text{HorRat} \leq 2$ であれば測定法が妥当であると判断されている¹⁸⁾。ORAC 法では Trolox 検量線範囲内に少なくとも1点が入るように試料を任意の4段階の倍率で希釈し、ORAC 値を Trolox 当量で表す。Trolox 検量線上限の濃度は $50 \mu\text{M}$ であるため、この濃度を Horwitz の式に代入し $PRSD_R$ を算出し、HorRat を計算した。その結果、HorRat は溶液試料では (+)-カテキン、ヘスペレチンで、粉末試料では (+)-カテキン、ヘスペレチン、コーヒー酸で2を超える値となり、今回の結果から妥当性が確認されたと判断しがたい (Table 2, 4)。

ORAC 法では抗酸化物質の種類により蛍光強度の減衰挙動が異なっており、2つのタイプに大別された。すなわち、抗酸化物質を添加することで、AAPH 添加後におけるフルオレセインの蛍光強度の減少が抑制されるが、蛍光強度減少まで lag time があって、その後急激に減少するタイプ (Trolox, *trans*-フェルラ酸, コーヒー酸) と、lag time がほとんど見られずに蛍光強度の減少が緩やかになるタイプ ((+)-カテキン, ヘスペレチン) である (Fig. 2)。今回の試験では、後者のタイプの抗酸化物質の RSD_R が前者のタイプと比較して高くなることが判明した。

さらに、併行精度と室間再現精度の比率をみると、 RSD_R に対する RSD_r の比 (RSD_r / RSD_R) が $1/2.4 \sim 1/5.5$ の範囲であった。化学分析法の併行精度は室間再現精度の $1/2 \sim 1/3$ を示すことが一般的であり、ORAC 法ではその値を下回るマテリアルも存在した。この結果は、ORAC 法が試験室もしくは測定者に依存した方法であること示しており、各試験室が報告した ORAC 値を比較すると、マテリアルの種類に関わらず、試験室 A, C は常に低値を、試験室 F, G は常に高値を報告する傾向が認められた (Table

Fig. 2 Changes in the fluorescence intensity of fluorescein after addition of AAPH in the presence of (+)-catechin (closed circles), Trolox (open circles), *trans*-ferulic acid (closed square), hesperetin (open square), or caffeic acid (closed triangle), and in the absence of antioxidative compound (blank, open triangle).

1, 3)。

今回の試験では、Trolox の粉末および溶液も測定試料として配付しており、それぞれの ORAC 値の理論値は $3876 \mu\text{mol TE/g}$ および $38.8 \mu\text{mol TE/L}$ となる。各試験室の測定値はこれらと同程度になることが期待され、11 試験室が測定した ORAC 値の平均値はこれらに近い数値となっているが、各試験室の測定値を見ると前記の試験室ごとの傾向が同様に確認された。そこで、各試験室が調製した Trolox 標準液の差異が室間再現性に及ぼす影響を確認するため、3 試験室で保存していた Trolox 標準液および Trolox 粉末を溶解して用事調製した溶液を用いて、単一試験室で検量線を作成し比較したが、差異は見られなかった (データ未掲載)。また、今回の室間共同試験で用いた粉末および溶液試料を -20°C で保存し、1 ヶ月後の H-ORAC 値を分注直後と比較した結果、有意な差は見られなかった

(データ未掲載)。そのため、測定試料の不均一性が充分な室間再現性が得られなかった原因である可能性は低いと考える。

次いで、各試験室が測定に用いているプレートリーダーの差異が、室間再現性に及ぼす影響について検討した。第一に、マイクロプレート底面からの測光方式を用いた試験室と、上部からの測光方式を用いた試験室の H-ORAC 値をマテリアルごとに比較した。F 検定により分散を比較したところ、すべてのマテリアルで測光方式の違いによる有意な差は見られなかった。また、t 検定により平均値を比較したところ、ヘスペレチンの溶液試料では底面からの測光方式を用いた試験室の H-ORAC 値が上部からの測光方式を用いた試験室の測定値より有意に低い値を示したが、それ以外のマテリアルでは有意な差は認められなかった。以上の結果より、測光方式の違いのみでは室間再現精度の低下は説明できないと考えた。次に、試料の代わりにすべてのウェルに 25 μ M Trolox 溶液を分注し、同様に測定したところ、本来等しい値となるはずの各ウェルの AUC にばらつきが確認され、最大値と最小値の間で最大 1.95 倍の差が生じた(データ未掲載)。さらに、マテリアルの種類に関わらず、常に低値を報告していた試験室 A, C は、Trolox 標準液を測定するウェルと比較して、試料を測定するウェルの AUC が常に低値を示す傾向にあり、一方常に高値を報告していた試験室 F, G は逆の傾向が認められた(各溶液のプレート内での配置は Fig. 1 に例示)。従って、用いたプレートリーダーの特性に起因するウェル間の AUC の差が、室間再現精度を低下させる大きな要因として考えられた。AAPH 添加前の蛍光強度はどの試験室においてもウェル間で顕著な差が認められないことから、フルオレセイン溶液の分注には問題がないと考えられる。AAPH からのペルオキシラジカル生成は温度依存性である¹³⁾ことを考えあわせると、測定中の各ウェルにおける温度が均一でなく、ペルオキシラジカルの生成量に差が生じたため、ウェル間の AUC がばらついた可能性が考えられた。ウェル間の AUC のばらつきを抑えることが室間再現精度の向上につながると考え、さらなる検討を行っている。

また、今回の室間共同試験では、配付試料として抗酸化物質の粉末試料と液体試料を用いた。抗酸化物質を溶媒に溶解すると酸化され易くなることが知られており、試料配付から測定を行う間の抗酸化物質の損失が懸念された。しかし、溶液試料と粉末試料の RSD_R をマテリアルごとに比較すると、ヘスペレチン以外ではおおよそ同程度の値であったことから、抗酸化物質の溶液状態での配付における変質の可能性は低く、室間共同試験の配付試料として抗酸化物質の溶液試料を用いても問題はないと考えられた。

要 約

本研究では、AOAC International の基準に基づき、代

表的な抗酸化物質を用いて抗酸化能測定法である H-ORAC 法の室間共同試験を行い、精度の調査を行った。室間共同試験には 5 種 ((+) -カテキン, Trolox, *trans*-フェルラ酸, ヘスペレチン, コーヒー酸) の抗酸化物質溶液および粉末を用いた。その結果、RSD_r は溶液試料で 5.9 ~ 13.2%, 粉末試料で 5.4 ~ 10.4% であり、RSD_R は溶液試料で 16.2 ~ 61.4%, 粉末試料で 16.9 ~ 33.2% であった。Trolox 検量線の上限濃度である 50 μ M から算出した HorRat 値は溶液試料で 1.48 ~ 5.62, 粉末試料で 1.54 ~ 3.03 であり、本室間共同試験によって妥当性が確認されたとは言い難かった。室間再現性低下の要因として、プレートリーダーの特性に起因するウェル間での蛍光強度変化の差異挙げられ、これを低減することが H-ORAC 法の室間再現性向上に重要と考えられた。

本研究の一部は、農林水産省委託プロジェクト「食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発」により行われた。本試験室間共同試験に参加し測定値を報告して頂いた、大阪市立大学、(財)食品分析開発センター SUNATEC、(財)日本食品分析センター名古屋支所、同彩都研究所、(独)国立健康・栄養研究所、(独)農研機構 九州・沖縄農業研究センター、同畜産草地研究所、同野菜茶業研究所、同果樹研究所、カゴメ(株)分析センター、アサヒビール(株)の担当者の皆様方に感謝いたします。

文 献

- 1) 大柳善彦, 井上正康, 活性酸素と NO の代謝特性, 「活性酸素と老化抑制」(共立出版, 東京), pp. 18-43 (2001).
- 2) Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L., The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1841-1856 (2005).
- 3) Naguib, Y.M.A., A fluorometric method for measurement of oxygen radical-scavenging activity of water-soluble antioxidants. *Anal. Biochem.*, **284**, 93-98 (2000).
- 4) Evelson, P., Travaclo, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S. and Lissi E.A., Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.*, **388**, 261-266 (2001).
- 5) 沖 智之, 抗酸化能評価法 (2) ORAC 法, 「食品機能性評価マニュアル集第 II 集」, 食品機能性評価支援センター編, (社)日本食品科学工学会, pp. 79-86 (2008).
- 6) Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, **299**, 152-178 (1999).
- 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 Biol. Med.*, **26**, 1231-1237 (1999).
- 8) Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A. and Deemer, E.K., Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic

- antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1815-1821 (2002).
- 9) 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).
- 10) Hakoda, A., Kasama, H., Sakaida, K., Suzuki, T. and Yasui, A., Determination of the moisture content of instant noodles : interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **89**, 1585-1590 (2006).
- 11) Hakoda, A., Sakaida, K., Suzuki T. and Yasui, A., Determination of acid value of instant noodles : interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **89**, 1341-1346 (2006).
- 12) 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, 食科工, **54**, 482-487 (2007).
- 13) Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies : Revised 1994 (Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, **67**, 331-344 (1995).
- 14) Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. and Jacob, R., Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3273-3279 (2003).
- 15) 日本規格協会編 : “JIS ハンドブック 57, 品質管理 2004”, p. 269 (2004).
- 16) 安井明美, 食品分析における信頼性確保, *The Chemical Times*, **191**, 13-18 (2004).
- 17) McClure, F.D. and Lee, J.K., Computation of HORRAT values. *J. AOAC Int.*, **86**, 1056-1058 (2003).
- 18) W. Horwitz (Ed.), "Official Methods of Analysis of AOAC Int" 17th ed, volume II, appendix D, p. 9 (2003).

URL cited

- i) <http://www.ars.usda.gov/SP2/UserFiles/Place/12354500/Data/ORAC/ORAC07.pdf> (Nov. 1, 2009)
- ii) <http://www.antioxidant-unit.com/detaile/index.htm>
(平成 22 年 7 月 28 日受付, 平成 22 年 8 月 20 日受理)