食品の抗酸化能

一重項酸素消去活性評価法 (SOAC 法) の開発

Antioxidant Activity of Foods

Development of Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) Assay Method

向井 和男

愛媛大学理学部化学科

〒790-8577

松山市文京町 2-5

Kazuo MUKAI

Department of Chemistry, Faculty of
Science, Ehime University

Bunkyo-cho 2-5, Matsuyama

790-8577, Japan

大内 綾

愛媛大学理学部化学科

〒790-8577

松山市文京町 2-5

Aya OUCHI

Department of Chemistry, Faculty of
Science, Ehime University

Bunkyo-cho 2-5, Matsuyama

790-8577, Japan

論文要旨: 25 種の天然抗酸化物質 (8 種の carotenoid 類, 6 種の tocopherol 誘導体, ubiquinol-10, 3 種の caffeic acid 類, 6 種の catechin 類, vitamin C を含む) に対する一重項酸素消去反応の速度論的研究が ethanol/chloroform/D₂O (50 : 50 : 1, v/v/v), および ethanol 溶液中, 35℃で行われた。抗酸化物質と一重項酸素の反応に対する 2 次反応の速度定数 (k_Q) を競争反応法を用いて測定した。一重項酸素の発生剤としてエンドパーオキシライド, 紫外・可視吸収のプロープとしてジフェニルベンゾフラン (DPBF), また, 基準物質として α -tocopherol を用いた。速度定数 (k_Q (S) および k_Q ($t_{1/2}$)) はそれぞれ DPBF の減衰曲線の一次反応速度定数 (S) と半減期 ($t_{1/2}$) から求められ, 互いに良い一致を示した。この測定法を使えば, k_Q (S) の値が lycopene に対する $1.38 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から, ferulic acid に対する $2.71 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ まで, 5 桁異なる反応速度を有する脂溶性と水溶性の抗酸化物質の一重項酸素消去活性を評価することが出来るようになった。同様な測定が 30 種に上る食品抽出物 (野菜, 果物, 油脂を含む) についても行われた。その結果から, 天然抗酸化物質や食品抽出物の一重項酸素吸収能 (singlet oxygen absorption capacity) を示す新しい評価法 (SOAC 法) が提案された。

Abstract: A kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) with 25 natural antioxidants (including 8 carotenoids, 6 tocopherol derivatives, ubiquinol-10, 3 caffeic acids, 6 catechins, and vitamin C) was performed in ethanol/chloroform/D₂O (50:50:1, v/v/v) and ethanol solutions at 35°C. The second-order rate constants, k_Q , for the reaction of antioxidants with $^1\text{O}_2$ were measured, using the competition reaction method, where endoperoxide was used as a singlet oxygen generator, 2,5-diphenyl-3,4-benzofuran (DPBF) as an UV-Vis absorption prove, and α -tocopherol was used as a standard compound. The rate constants, k_Q (S) and k_Q ($t_{1/2}$), were determined by analyzing the first-order rate constant (S) and the half-life ($t_{1/2}$) of the decay curve of DPBF with antioxidants, respectively, showing good accordance with each other. The method is useful to evaluate the $^1\text{O}_2$ -quenching activity of lipophilic- and hydrophilic-antioxidants having five orders of magnitude different rate constants from $1.38 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for lycopene to 2.71×10^5 for ferulic acid. Similar measurements were performed for 30 kinds of food extracts including vegetable, fruit, and edible oil extracts. From the results, a new assay method which can quantify the singlet oxygen absorption capacity (SOAC) of natural antioxidants and food extracts has been proposed.

Key words: singlet oxygen, quenching rate, natural antioxidants, food extracts, SOAC value

1 はじめに

生体内での活性酸素の過剰発生は、生活習慣病を始めとする種々の疾病の原因と言われている。そのため、野菜、果物や油脂などの農産物や食品による活性酸素の消去活性（即ち、抗酸化活性）は疾病予防などの観点から注目されている。活性酸素にはいくつかの種類があり、脂質過酸化ラジカル（ $\text{LOO}\cdot$ ）や一重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）がその代表例である。食品のラジカル消去活性については、Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC) 法を代表として、数種の方法が開発され、既に多くの研究報告が行われている^{1, 2)}。ラジカル消去には、主に vitamin E や polyphenol など、phenol 系の抗酸化物質 (antioxidant, AO) の寄与が高いことから、ORAC 法は農産物や食品に多く含まれる phenol 系 AO の抗酸化活性分析に適した方法である。一方、phenol 系 AO と双璧をなす carotenoid 系 AO は高い $^1\text{O}_2$ 消去活性を示すことが知られている³⁾。しかしながら、ラジカル消去活性は低く、ORAC 法での測定ではその正しい抗酸化活性の評価を行うことが出来ない。

AO による $^1\text{O}_2$ の消去速度 $k_Q (=k_q + k_r, \text{physical quenching} + \text{chemical reaction})$ (反応式 (1)) は、 $^1\text{O}_2$ の 1270 nm における近赤外発光を AO の存在下でゲルマニウムフォトダイオード検出器を用いて測定し、その解析結果から求めることが出来る³⁾。しかしながら、測定機器が高価で、この方法は一般的に普及されていない。

$$k_Q$$

後に述べるように、我々は、紫外・可視分光光度計のような一般的な分析装置でも測定できる簡易的な $^1\text{O}_2$ 消去活性の評価法として、Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) 法を開発した⁴⁻⁶⁾。この方法は科学的に信頼性の高い $^1\text{O}_2$ 消去活性の測定法であることが認められ、官学に加え、100 社以上の食品企業の賛助会員からなる Anti-Oxidant Unit (AOU) 研究会において、ORAC 法では測定できない食品の $^1\text{O}_2$ 消去活性の測定法として採用されている。食品の $^1\text{O}_2$ 消去活性は世界的にも研究・報告例が殆ど無く、SOAC 法は食品の $^1\text{O}_2$ 消去活性の測定について日本発の国際基準となり得る測定法である。本総説では SOAC 法についての解説を行う。

2 競争反応法を用いた一重項酸素消去速度 (k_Q) の測定

AO の $^1\text{O}_2$ 消去速度 (k_Q) (即ち、 $^1\text{O}_2$ 消去活性) の測定には競争反応法 (Fig. 1) が一般的に用いられる。 $^1\text{O}_2$

Fig. 1 Measurement of the second-order rate constants (k_Q) for the reaction of antioxidants with $^1\text{O}_2$, using competition reaction method.

の発生方法としてローズベンガルなどの色素に光を照射する方法 (Type II の光増感反応) が良く使われるが、光照射による AO や共存する他の成分の劣化が起こるので良い方法とは言えない。そこで、我々は $^1\text{O}_2$ 発生剤として endoperoxide (EP) を用い、ethanol/chloroform/ D_2O (50:50:1, v/v/v) 溶液 (mixed solvent と略す) 中、35.0℃で、熱分解により EP から生成される $^1\text{O}_2$ と AO の反応を、6 連装分光光度計を用いて追跡した^{7, 8)}。これまで、EP は市販されていなかったため、測定には先ずその合成が必要であり、研究の妨げとなっていた。しかしながら、最近、試薬会社から購入が可能になった⁹⁾。また、UV-Vis 吸収プローブとして 2,5-diphenyl-3,4-benzofuran (DPBF) ($\lambda_{\text{max}} = 413 \text{ nm}$) を用いた。Fig. 2 (A) は DPBF と EP を β -carotene (β -Car) の非存在下 ((a) Blank) と、存在下 ((c)-(f)) で反応させた場合の例を示す⁴⁾。この反応により、DPBF と $^1\text{O}_2$ の間に化学反応が起こり、413 nm に於ける DPBF の吸収の減衰が見られる。また、 β -Car の濃度 ($[\beta\text{-Car}]$) の増加とともに、DPBF の減少が抑えられていることが分かる。このことは、 β -Car が $^1\text{O}_2$ と反応して、それを消去していることを示している。Fig. 2 (E) に示したように、 β -Car は 413 nm に吸収を示すので、DPBF の吸収と β -Car の吸収が 413 nm で重なっていることが分かる。従って、これを baseline として差し引くことが必要である。その結果を Fig. 2 (B) に示した。DPBF の吸光度 (Absorbance) の減衰曲線の対数プロット ($\ln \text{Absorbance vs. } t \text{ plot}$) が直線を示すことから (data are not shown), この反応は擬一次反応であることが分かる。

$^1\text{O}_2$ 消去反応速度 (k_Q) は (2) 式を用いて求めることができる^{10, 11)}。

$$S_{\text{Blank}}/S_{\beta\text{-Car}} = 1 + (k_Q^{\beta\text{-Car}}/k_d) [\beta\text{-Car}] \quad (2)$$

ここで、 S_{Blank} および $S_{\beta\text{-Car}}$ は β -Car の非存在下 ((a) Blank) と存在下 ((c)-(f)) における擬一次反応の速度である。擬一次反応の条件が満たされる時間範囲 (~5

Fig. 2 (A) Change in absorbance of DPBF at 413 nm during the reaction of DPBF with $^1\text{O}_2$ in the absence and presence of sample (α -Toc or β -Car) in mixed solvent. (B) Change in absorbance of DPBF, where the correction of baseline due to β -Car was performed. (C) Plot of $S_{\text{Blank}}/S_{\beta\text{-Car}}$ vs $[\beta\text{-Car}]$. (D) Plot of $t_{1/2}^{\beta\text{-Car}}/t_{1/2}^{\text{Blank}}$ vs $[\beta\text{-Car}]$. (E) UV-Vis absorption spectrum of β -Car.

$< t < \sim 60 \text{ min}$) における DPBF の減衰曲線から求めた S_{Blank} および $S_{\beta\text{-Car}}$ の値を Table 1 にまとめた⁴⁻⁶⁾。 $S_{\text{Blank}}/S_{\beta\text{-Car}}$ vs. $[\beta\text{-Car}]$ プロットを Fig. 2 (C) 示した。この勾配から $k_Q^{\beta\text{-Car}}(S)$ の値 ($1.04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) が得られる。同じ測定を 3 回行い、得られた平均値を Table 2 に纏めた。ここで、mixed solvent 中における $^1\text{O}_2$ の自己減衰速度 (k_d) として既報の $3.03 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ の値を用いた³⁾。

k_Q の測定には ethanol 溶媒が用いられることが多い。しかしながら、一般的に carotenoid 類の ethanol に対する溶解度は低い。一方、carotenoid 類は chloroform に良く溶けるので、最初、この溶媒を用いて測定が試みられた。しかしながら、chloroform 中では DPBF が徐々に分解するのでこの溶媒を用いることは出来なかった。結局、Di Mascio らが用い³⁾、 $^1\text{O}_2$ の k_d 値も報告されて

Table 1 Employed concentrations, first-order decay rates (S), and half-lives ($t_{1/2}$) of blank (DPBF only), α -Toc, and β -Car and relative SOAC values in mixed solvent.

	Blank	α -Toc	β -Car-1	β -Car-2	β -Car-3	β -Car-4
conc. (M)	0	5.00×10^{-4}	3.72×10^{-6}	5.57×10^{-6}	1.11×10^{-5}	1.86×10^{-5}
S (s^{-1})	0.0349	0.0124	0.0146	0.0117	0.0071	0.0047
$t_{1/2}$ (min)	20.3	54.8	45.2	55.4	88.7	147.9
Relative SOAC value	—	—	97.0	91.1	88.8	99.4 (Av. 94.1)

Table 2 The $k_Q^{AO}(S)$ and $k_Q^{AO}(t_{1/2})$ values for 8 carotenoids (AO) and α -tocopherol in mixed solvent, relative rate constants ($k_Q^{AO}(S)/k_Q^{\alpha-Toc}(S)$), and relative SOAC values.

antioxidant	$k_Q^{AO}(S)$ $/M^{-1}s^{-1}$	$k_Q^{AO}(t_{1/2})$ $/M^{-1}s^{-1}$	$k_Q^{AO}(S)$ $/k_Q^{\alpha-Toc}(S)$	relative SOAC value
α -Toc 1	1.31×10^8	1.29×10^8	1.00	1.00
lycopene (Lyc)	1.38×10^{10}	1.26×10^{10}	105	123
astaxanthin (Ast)	1.17×10^{10}	1.08×10^{10}	89.3	109
β -carotene (β -Car)	1.08×10^{10}	1.06×10^{10}	82.4	95.8
capsanthin (Cap)	1.06×10^{10}	1.07×10^{10}	80.9	99.3
zeaxanthin (Zea)	1.05×10^{10}	1.01×10^{10}	80.2	92.8
α -carotene (α -Car)	9.76×10^9	8.96×10^9	74.5	92.4
lutein (Lut)	9.24×10^9	9.05×10^9	70.5	73.8
β -cryptoxanthin (β -Cry)	7.31×10^9	6.94×10^9	55.8	67.6

いる、上述の mixed solvent が測定に用いられた。

上に述べたように、Fig. 2 (B) に示した DPBF の減衰速度 ($S_{\beta-Car}$) は 1 次反応である。従って、 $S_{\beta-Car}$ と半減期 ($t_{1/2}^{\beta-Car}$) の間には、 $t_{1/2}^{\beta-Car} = \ln 2 / S_{\beta-Car}$ の関係が存在する。この関係を (2) 式に代入すると (3) 式が得られる。

$$t_{1/2}^{\beta-Car} / t_{1/2}^{Blank} = 1 + (k_Q^{\beta-Car} / k_d) [\beta-Car] \quad (3)$$

Table 1 に 4 種の β -Car 濃度に対して求めた $t_{1/2}^{\beta-Car}$ の値を、また、Fig. 2 (D) に $t_{1/2}^{\beta-Car} / t_{1/2}^{Blank}$ vs. $[\beta-Car]$ プロットを示した。この勾配から求めた $k_Q^{\beta-Car}(t_{1/2})$ ($1.01 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$) の値は上述の $k_Q^{\beta-Car}(S)$ と良い一致を示している。Table 2 に他の carotenoid 類について得られた $k_Q^{Sample}(t_{1/2})$ の値も示した。 $k_Q^{Sample}(t_{1/2}) / k_Q^{Sample}(S)$ の比が 1 に近い値を示すことから、半減期による反応速度の解析が有用であることが分かる。

3 抗酸化物質の一重項酸素消去活性評価に関する新しい概念 (SOAC 法) の提案

代表的な脂溶性の抗酸化剤として知られる α -tocopherol (α -Toc) を基準物質として用い、上述の半減期の測定から carotenoid 類の 1O_2 消去活性の評価を試みた。 α -Toc の $k_Q^{\alpha-Toc}$ 値は (3) 式と同様に (4) 式で表すことができる。

$$t_{1/2}^{\alpha-Toc} / t_{1/2}^{Blank} = 1 + (k_Q^{\alpha-Toc} / k_d) [\alpha-Toc] \quad (4)$$

(3), (4) 式から k_d を消去すると、(5) 式が得られる。

$$\begin{aligned} \text{Relative SOAC Value (Based on molar concentration unit (M = mol/L))} \\ = \{ (t_{1/2}^{\beta-Car} - t_{1/2}^{Blank}) / (t_{1/2}^{\alpha-Toc} - t_{1/2}^{Blank}) \} \times \{ [\alpha-Toc] (M) / [\beta-Car] (M) \} \\ = k_Q^{\beta-Car} (M^{-1}s^{-1}) / k_Q^{\alpha-Toc} (M^{-1}s^{-1}) \end{aligned} \quad (5)$$

(5) 式から明らかなように、その右辺は β -Car と α -Toc の 1O_2 消去速度の比になっている。そこで、(5) 式を α -Toc を基準とした場合の carotenoid を含む AO の 1O_2 消去能の評価値とし、これを Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) Value と命名した。

Fig. 2 (A) に示したように、まず、[EP] と [DPBF] だけが存在する条件下で反応を行い、 $t_{1/2}^{Blank}$ の値を求める。次に、 α -Toc と β -Car の存在下で反応を行い、それぞれ、 $t_{1/2}^{\alpha-Toc}$ と $t_{1/2}^{\beta-Car}$ の値を求め、(5) 式から SOAC 値を得ることができる。Table 1 に示したように、4 種の β -Car 濃度に対して求めた SOAC の平均値は 94.1 で在った。この結果は、 β -Car が α -Toc に比べ約 94 倍の 1O_2 吸収能を持っていることを示している。Table 2 に示した消去速度の比は 82.4 であり、SOAC 値とほぼ一致した値となっていることが分かる。

Fig. 3 Comparison of the relative SOAC values for (A) tocopherol derivatives, ubiquinol-10, caffeic acids, catechins, and vitamin C and for (B) carotenoids, tocopherol derivatives, and ubiquinol-10 in mixed solvent.

4 25種の天然抗酸化物質の一重項酸素消去速度 (k_Q) と SOAC 値の測定

同様に、mixed solvent 中で8種の carotenoid 類と α -Toc に対する k_Q^{AO} (S) と SOAC 値を測定した。各 carotenoid についてそれぞれ3回測定を行い、得られた値の平均値を Table 2 にまとめた。Carotenoid 類の k_Q^{AO} (S) 値は、Lyc>Ast> β -Car>Cap>Zea> α -Car>Lut> β -Cry (carotenoid 類の略称は Table 2 参照) の順に減少した^{4, 5)}。しかしながら、 k_Q^{AO} (S) の値の変化は少ない。一方、 α -Toc に比べるとその値は50~100倍大きい。SOAC 値も同様な傾向を示した。さらに、16種の phenol 系 AO と vitamin C について同様な測定を行った⁶⁾。その結果を Fig. 3 と Table 3 に纏めた。Table 2 と 3 を見れば明らかのように、この方法を用いて、 k_Q (S) = $10^5 \sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の5桁異なる $^1\text{O}_2$ 消去活性(即ち、5桁異なる SOAC 値)を有する脂溶性及び水溶性 AO の活性を評価できることが明らかになった。また、ethanol 溶媒中においても同様な測定を行った。

Fig. 4 と 5 に示したように、phenol 系 AO の k_Q (S) および SOAC 値の対数値は AO の酸化電位 (E_p) と良い相関を示し、 E_p の低い AO が高い活性を示すことが分かった⁶⁾。さらに、Fig. 6 に示したように、ethanol と mixed solvent 中に於ける k_Q (S) 値の比は一定の値を

Table 3 The k_Q^{AO} (S) and $k_Q^{AO}(t_{1/2})$ values for 16 phenolic antioxidants (AO) and vitamin C in mixed solvent, relative rate constants ($k_Q^{AO}(S)/k_Q^{\alpha\text{-Toc}}(S)$), relative SOAC values, and oxidation potentials (E_p).

antioxidant	$k_Q^{AO}(S)$ / $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_Q^{AO}(t_{1/2})$ / $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_Q^{AO}(S)$ / $k_Q^{\alpha\text{-Toc}}(S)$	relative SOAC value	E_p/mV vs SCE
α -Toc 1	1.31×10^8	1.29×10^8	1.00	1.00	860
β -Toc 2	9.30×10^7	8.34×10^7	0.710	0.866	920
γ -Toc 3	8.44×10^7	7.09×10^7	0.644	0.706	930
δ -Toc 4	4.11×10^7	3.86×10^7	0.314	0.380	990
tocol 5	1.84×10^7	1.61×10^7	0.140	0.162	1050
trolox 6	4.20×10^7	3.66×10^7	0.321	0.349	890
ubiquinol-10(UQ ₁₀ H ₂) 7	6.22×10^7	5.86×10^7	0.475	0.521	930
isoeugenol(IE) 8	2.98×10^6	2.53×10^6	0.0227	0.0258	1200
caffeic acid(CA) 9	6.85×10^5	5.85×10^5	0.00523	0.00659	1260
ferulic acid(FA) 10	2.71×10^5	2.08×10^5	0.00207	0.00228	1330
epicatechin(EC) 11	8.31×10^6	7.85×10^6	0.0634	0.0752	1070
epigallocatechin(EGC) 12	1.31×10^7	1.30×10^7	0.100	0.122	980
epicatechin gallate(ECG) 13	4.94×10^6	3.61×10^6	0.0377	0.0375	840
epigallocatechin gallate(EGCG) 14	5.05×10^6	4.27×10^6	0.0385	0.0424	820
4-methylcatechol(4-MC) 15	4.96×10^6	4.12×10^6	0.0379	0.0474	1080
4-methyl gallate(4-MG) 16	1.34×10^5	1.05×10^5	0.00102	0.00119	1370
vitamin C(Vit C)	1.92×10^6	1.88×10^6	0.0147	0.016	—

Fig. 4 Plots of $\log k_Q(S)$ (mixed solvent) vs E_p for 16 phenolic antioxidants.

Fig. 5 Plot of $\log \text{SOAC}$ vs E_p for 16 phenolic antioxidants.

示した。この結果から、 $\alpha\text{-Toc}$ を基準物質として用いた場合、相対的な SOAC 値は溶媒によって変化しないことが明らかになった。

AO や、食品抽出物の溶解度は溶媒の種類により異なる。従って、測定対象により極性の高い溶媒や、極性の低い溶媒を用いなければならない。上に述べたように、carotenoid 類は一般に ethanol に溶けにくいので mixed solvent を用いた測定が必要である。一方、catechin 類などの polyphenol 類は ethanol 溶媒を用いなければ正しい k_Q や SOAC 値が求まらない場合がある。しかしながら、 $\alpha\text{-Toc}$ を基準物質として用いた場合、相対的な SOAC 値は溶媒によって変化しないので、異なった溶媒中で得られた SOAC 値をそのまま用いて、抗酸化能の比較を行うことが出来る⁶⁾。

Fig. 6 (A) Plot of $k_Q(S)$ (EtOH) vs $k_Q(S)$ (mixed solvent) for 16 phenolic antioxidants. (B) Plot of $k_Q(S)$ (EtOH) vs $k_Q(S)$ (mixed solvent) for 16 phenolic antioxidants and 6 carotenoids.

5 食品への SOAC 法の適用

次に、食品への SOAC 法の応用を試みた。野菜、果物、油脂などの食品抽出物の試料は、食品を凍結乾燥後、mixed solvent で抽出して作成した^{4, 5)}。食品抽出物の場合はモル濃度 ($M = \text{mol/l}$) で表すことができない。従って、(5) 式に於ける抽出物の濃度を g/l 単位で表し、(6) 式を用いて SOAC 値の評価を行うことが必要になる。

$$\begin{aligned} \text{Relative SOAC Value (given on a weight basis (g/L))} &= \{(t_{1/2}^{\text{Sample}} - t_{1/2}^{\text{Blank}}) / (t_{1/2}^{\alpha\text{-Toc}} - t_{1/2}^{\text{Blank}})\} \times \{[\alpha\text{-Toc}] \\ &\quad (\text{g/L}) / [\text{Sample}] (\text{g/L})\} \\ &= k_Q^{\text{Sample}} (\text{L g}^{-1} \text{s}^{-1}) / k_Q^{\alpha\text{-Toc}} (\text{L g}^{-1} \text{s}^{-1}) \end{aligned} \quad (6)$$

しかしながら、測定や解析方法は全く変わらないので、食品への SOAC 法の適用が可能である。トマト、ニン

Table 4 Rate constants ($k_Q^{\text{Sample}}(S)$ and $k_Q^{\text{Sample}}(t_{1/2})$ (in $\text{L g}^{-1}\text{s}^{-1}$ unit)) obtained from $S_{\text{Blank}}/S_{\text{Sample}}$ vs $[\text{Sample}]$ (in g/L unit) and $t_{1/2}^{\text{Sample}}/t_{1/2}^{\text{Blank}}$ vs $[\text{Sample}]$ plots, respectively, the ratios ($k_Q^{\text{Sample}}(S)/k_Q^{\alpha\text{-Toc}}(S)$), and relative SOAC values for the reaction of $^1\text{O}_2$ with vegetable extracts in mixed solvent.

vegetable extract	$k_Q^{\text{Sample}}(S)$ $/(\text{L g}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_Q^{\text{Sample}}(t_{1/2})$ $/(\text{L g}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_Q^{\text{Sample}}(S)/k_Q^{\alpha\text{-Toc}}(S)$	relative SOAC value
$\alpha\text{-Toc}$	3.04×10^5	3.00×10^5	1.00	1.00
red paprika	3.09×10^4	2.86×10^4	0.102	0.117
carrot	1.48×10^4	1.25×10^4	0.0486	0.0530
tomato	1.85×10^4	1.70×10^4	0.0608	0.0727

ジン、赤ピーマンなど、carotenoid 類を多く含む野菜について得られた結果を Table 4 に纏めた^{4, 5)}。トマト、ニンジン、赤ピーマンについて得られた SOAC 値はそれぞれ 0.0727, 0.0530, 0.117 である。このことは、野菜抽出物 1 g が、それぞれ、0.0727, 0.0530, 0.117 g の pure $\alpha\text{-Toc}$ に匹敵する一重項酸素消去能を有するということを意味している。また、キュウリ、カボチャなどの野菜や、ミカン、メロンなどの果物、パーム油などの油脂を含む、30 種に上る食品に関しても SOAC 法の適用が可能であった¹²⁻¹⁴⁾。

6 野菜抽出物に対する一重項酸素消去活性の実測値と計算値の比較

食品抽出物には AO の他に、一般的には炭水化物、脂肪、蛋白質など多くの成分が含まれている。従って、これらの系で SOAC 値の正しい評価が可能か否かの検討が必要である。例えば、ニンジンには主に $\alpha\text{-Car}$, $\beta\text{-Car}$, Lut の 3 種のカロテノイド類が含まれている。この様な場合、ニンジンについて期待される抗酸化反応の速度は、(7) 式を用いて計算される。

$$S_{\text{Blank}}/S_{\text{Sample}} = 1 + \{\Sigma k_Q^{\text{Car-}i}(S) [\text{Car-}i]\} / k_d \quad (7)$$

$k_Q^{\text{Car-}i}(S)$ と $[\text{Car-}i]$ はそれぞれ含有された carotenoid 類の $^1\text{O}_2$ 消去速度と濃度である。 $[\text{Car-}i]$ を HPLC で求め、Table 2 に示した $k_Q^{\text{Car-}i}(S)$ 値を (7) 式に代入して計算した値を実測値と比較した。Fig. 7 に示す様に、ニンジンの場合、計算値と実測値が見事に一致していることが分かる⁵⁾。一方、トマトや赤ピーマンの場合は、計算値が実測値よりも低い値を示すが、これは、HPLC 分析の対象とした carotenoid 類が 7 種に限られていたためである。例えば、トマトには phytoene や phytofluene などが多く含まれており、他の含有 carotenoid も考慮すると、一致はさらに良くなることが期待される⁵⁾。

最近行ったパーム油抽出物についても、8 種の vitamin E 同族体と 3 種の carotenoid 類の含有濃度を用

Fig. 7 Plot of $\{(S_{\text{Blank}}/S_{\text{Sample}})-1\}$ (Obsd.) vs $\{(S_{\text{Blank}}/S_{\text{Sample}})-1\}$ (Calcd.). Measurements of $\{(S_{\text{Blank}}/S_{\text{Sample}})-1\}$ (Obsd.) values were performed for the solutions including vegetable extracts (tomato, carrot, and red paprika) in mixed solvent. (○) Tomato. (□) Carrot. (△) Red paprika.

いて、(7) 式による計算を行うと、 $^1\text{O}_2$ 消去速度 ($k_Q(S)$) と SOAC 値に対する計算値と実測値が良い一致を示した¹⁴⁾。AO と他の多くの含有成分間の相互作用は SOAC 値に影響を与えないことが明らかになった。

7 マイクロプレートリーダーを用いた SOAC 値の測定法の確立

多くの食品抽出物の SOAC 値を短時間で求めるには、マイクロプレートリーダーを用いた測定法の確立が必要であるが、sample holder を有機溶媒にも適用可能な石英に変えることにより、その測定が可能になった¹⁵⁾。

現在、我々は生体膜のモデルとしてのミセル系での SOAC 値の測定に取り組んでいる。さらに、血液、肝臓、

皮膚など、生体組織における SOAC 値の測定も計画しており、その成果が期待される。

8 おわりに

最初に述べたように、食品のフリーラジカル消去能力を分析する方法として、米国で開発された ORAC 法が用いられてきた^{1, 2)}。しかしながら、この評価法には問題点も多く、昨年、米国農務省が実態に合わないとしてウェブからデータベースを削除した。従って、これに代わる新しいラジカル消去活性の評価方法の開発が待たれる。一方、上に述べたように、SOAC Assay 法は、抗酸化能が異なる脂溶性と水溶性の多種多様な AO や食品抽出物などに適用が可能である。昨年、一重項酸素発生試薬 (EP) が市販されたことと併せて⁹⁾、今後、多くの研究者による農産物や、食品、サプリメントを対象とした測定が進むことが期待される。近い将来、SOAC 値が食品やサプリメントに表示され、人の健康増進に役立てられる日が来ることが夢である。

最後に、SOAC 法の開発に関して共同研究を行って頂いた愛媛大学の長岡伸一先生、カゴメ (株) の岩崎裕子、高橋慎吾、相澤宏一、稲熊隆博様、徳島大学の寺尾純二先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4619-4626 (2001).
- 2) D. Huang, B. Ou, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1841-1856 (2005).
- 3) P. Di Mascio, S. Kaiser, H. Sies, *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 532-538 (1989).
- 4) A. Ouchi, K. Aizawa, Y. Iwasaki, T. Inakuma, J. Terao, S. Nagaoka, K. Mukai, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 9967-9978 (2010).
- 5) K. Aizawa, Y. Iwasaki, A. Ouchi, T. Inakuma, S. Nagaoka, J. Terao, K. Mukai, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 3717-3729 (2011).
- 6) K. Mukai, A. Ouchi, S. Takahashi, K. Aizawa, T. Inakuma, J. Terao, S. Nagaoka, *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 7905-7916 (2012).
- 7) K. Mukai, K. Daifuku, K. Okabe, T. Tanigaki, K. Inoue, *J. Org. Chem.*, **56**, 4188-4192 (1991).
- 8) K. Mukai, S. Nagai, K. Ohara, *Free Radical Biol. Med.*, **39**, 752-761 (2005).
- 9) Endoperoxide (EP) は WAKEN B TECH Co., Ltd. から市販されている。
- 10) R. H. Young, K. Wehrly, R. L. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 5774-5779 (1971).
- 11) M. J. Thomas, C. S. Foote, *Photochem. Photobiol.*, **27**, 683-693 (1978).
- 12) 岩崎裕子, 高橋慎吾, 相澤宏一, 稲熊隆博, 大内 綾, 向井和男, 長岡伸一, 寺尾純二, 第 65 回日本酸化ストレス学会 P53 (2012).
- 13) 相澤宏一, 高橋慎吾, 岩崎裕子, 稲熊隆博, 大内 綾, 長岡伸一, 寺尾純二, 向井和男, 第 65 回日本酸化ストレス学会 S1-4 (2012).
- 14) 石川絵理, 大内 綾, 長岡伸一, 向井和男, 泉澤勝弘, 小池泰介, 第 9 回日本トコトリエノール研究会 演題 2 (2012).
- 15) 高橋慎吾, 岩崎裕子, 相澤宏一, 稲熊隆博, 大内 綾, 向井和男, 長岡伸一, 寺尾純二, 第 65 回日本酸化ストレス学会 P54 (2012).