

鰹だしおよび各種だしにおける DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の相関性の検討

Correlation Between the DPPH Radical Scavenging Activity and ORAC for Dried Bonito and Other Stock Types

山田 潤*[§] 赤堀 雄介* 松田 秀喜* 長谷川喜朗** 前田 俊道** 原田 和樹**
 Jun Yamada Yusuke Akahori Hideki Matsuda Yoshiro Hasegawa Toshimichi Maeda Kazuki Harada

The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) was evaluated for *arabushi-dashi* and *karebushi-dashi* prepared at various temperatures for various times. The ORAC value for both types of dashi increased with increasing temperature, the highest degree of extraction being at 100°C for 30 min. *Arabushi-dashi* showed a higher ORAC value than *karebushi-dashi* under all conditions. The DPPH radical scavenging activity behaved in a similar manner to the ORAC value, these values being well correlated. The DPPH radical scavenging activity and ORAC value were each evaluated for *niboshi-dashi*, *kombu-dashi*, and *shiitake-dashi*. *Niboshi-dashi* had the lowest value, while *shiitake-dashi* had the highest value among the three types of dashi. The DPPH radical scavenging activity and ORAC value for these three types of dashi and *katsuo-dashi* were well correlated.

キーワード：鰹だし dried bonito stock (*katsuo-dashi*)；DPPH ラジカル DPPH radical；活性酸素吸収能力 ORAC；抗酸化 antioxidant；昆布だし Japanese kelp stock (*kombu-dashi*)；煮干しだし dried anchovy stock (*niboshi-dashi*)

緒言

食品の抗酸化能の評価については測定原理が異なるさまざまな方法が提案されている¹⁻⁶⁾。近年抗酸化能を客観的に評価できる新たな指標として活性酸素吸収能力 (ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity) が注目されている。ORAC は 2, 2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) ジハイドロクロライド (AAPH) をラジカル発生剤に用いる。AAPH は水溶性であり、生成したペルオキシラジカルは脂質ミセル、リン酸型リポソーム、赤血球膜の脂質自動酸化に伴うラジカル連鎖反応を引き起こすことが知られている⁷⁾。この方法は Cao ら⁸⁾ によって血漿中の抗酸化能を測定する方法として開発され、米国農務省 (USDA) の Prior ら⁹⁾ によって改良が行われてきたペルオキシラジカル消去活性能を測る方法である。食品中の抗酸化能を分析する方法として、野菜や果物などの食品素材を中心に米国内で多くのデータが発表され、食品 277 種類の ORAC 値がデータベース化されている。米国での認知度は高く、既に ORAC 値を表記したサプリメントや飲料の上市が進んでおり、消費者にその食品がどれだけ抗酸化能があるかを具体的な数値で示している¹⁰⁾。しかし、我が国においてはまだ十分に普

及しておらず、調味料では大豆醤油や魚醤油について測定されている程度である¹¹⁾。日本の伝統的な調味料である鰹だしをはじめとする“だし”についての報告はない。

そこで本研究は、様々な抽出条件における荒節だしと枯節だしの ORAC 値を測定し、DPPH (1, 1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) ラジカル消去活性との相関性を検討した。さらに、各種だしを対象を広げ、DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値を測定し、両測定値を比較した。

実験方法

(1) 試薬および試料

試薬類はいずれも特級試薬を用いた。

鰹節は静岡県焼津産の荒節と枯節を使用し、研究室でミキサーにて粉碎したものを使用した。煮干しは瀬戸内産のカタクチイワシで小羽の大きさのものを使用し、頭および内臓を除き半身に裂いて用いた。昆布は北海道産の真昆布を使用した。乾しいたけは原木生産された国産のどんこを使用した。

(2) 試料の調製

だし素材の使用量は水道水 1,000 mL に対して 50 g とし、以下のように試料を調製した。

荒節および枯節は前報¹²⁾ と同様、40°C 10 分、60°C 10 分、80°C 10 分、100°C 10 分、100°C 30 分、100°C 60 分の条件で抽出を行った。

煮干しは、浸水を行わない場合は沸騰継続時間 10 分から 30 分で嗜好性の高いだし汁が得られるとの報告¹³⁾ があることから、水から火にかけ、20 分間沸騰を継続して

* 焼津水産化学工業株式会社
(Yaizu Suisankagaku Industry Co., Ltd.)

** 独立行政法人水産大学校
(Graduate School of Fisheries Science, National University)

[§] 連絡先 焼津水産化学工業株式会社 調味料開発部 研究 G
〒425-8570 静岡県焼津市小川新町 5-8-13
TEL 054 (621) 0122 FAX 054 (629) 1994

抽出を行った。

昆布は浸水時間の影響を考慮¹⁴⁾し、加熱前に30分間浸漬してから火にかけ、沸騰直前に引き上げた。

乾しいたけは冷蔵庫で一晩浸漬した戻し汁を用いた¹⁵⁾。

抽出間の水分蒸発量は、抽出終了後に加水調整を行い、No.2のろ紙（アドバンテック社）でろ過して試料とした。

(3) ORAC の測定

ORAC の測定は Huang らの方法¹⁶⁾、津志田らの方法¹⁷⁾を一部改変し、試料量、フルオレセイン溶液および AAPH 溶液の濃度、量は検出に最適となる条件で行った。庫内温度を 37℃ に設定した MithrasLB 940 マルチラベルプレートリーダー（ベルトールド社製）を用い、スタンダードにはビタミン E の安定な同族体である Trolox、プランクには 75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いた。マイクロプレートの各ウェルに適宜希釈した試料 20 μ L、94.4 nM フルオレセイン/75 mM リン酸緩衝液 200 μ L を入れてプレートリーダーにセットした。15 秒間振盪後、10 分間静置した。31.7 mM AAPH/75 mM リン酸緩衝液 75 μ L を自動注入して 15 秒間振盪させた後、2 分間隔で 90 分間経時的に蛍光強度（励起波長 485 nm、検出波長 535 nm）を測定した。

得られた蛍光強度から各試料の曲線下面積（AUC）を次式より算出した。

$$AUC = (0.5 + f_{10min}/f_{8min} + f_{12min}/f_{8min} + \dots + f_{90min}/f_{8min}) \times 2$$

f_{xmin} = 測定開始 x 分後の試料または Trolox の蛍光強度

f_{8min} = 測定開始 8 分後のプランクの蛍光強度

得られた AUC から、次式によって netAUC を算出した。

$$NetAUC_{Trolox} = AUC_{Trolox} - AUC_{プランク}$$

$$NetAUC_{試料} = AUC_{試料} - AUC_{プランク}$$

各 Trolox 溶液の濃度（ μ M）を Y 軸に、各 Trolox 溶液の netAUC を X 軸にとったグラフより、一次回帰式（ $y = ax + b$ ）を算出した。この回帰式から、次式によって ORAC を算出した。

$$ORAC \text{ 値} (\mu\text{mol Trolox 当量} / 100 \text{ mL})$$

$$= (a \times (netAUC_{試料}) + b) / [試料] \times 100$$

[試料]：試料濃度（L/mL）

ORAC 値は試料 100 mL あたりの Trolox 当量（ μ mol TE）として示した。

(4) DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性は前報⁶⁾と同様の方法で測定した。試料 800 μ L に 0.5 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 200 μ L および 500 μ M DPPH-エタノール溶液 1 mL を加え、50℃ 20 分間遮光状態で反応させた後、50% エタノールを 2 mL 添加し、517 nm の吸光度を測定した。プランクはサンプルの代わりに水を加えた。

ラジカル消去率は次式より算出した。

$$\text{ラジカル消去率} (\%)$$

$$= (\text{吸光度}_{プランク} - \text{吸光度}_{試料}) \div \text{吸光度}_{プランク} \times 100$$

結果は、DPPH ラジカル消去率 50% を示すサンプル濃度である IC₅₀ (%) を求め、Trolox の IC₅₀ (%) を基準として換算した試料 100 mL あたりのラジカル消去活性を Trolox 当量（ μ mol TE）として示した。

結 果

(1) 荒節だし、枯節だしの各種抽出条件における DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値ならびに両測定値の比較

抽出時の各温度および時間における荒節だしの DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の測定結果を図 1 に示した。DPPH ラジカル消去活性は 40℃ 10 分の抽出において 84.2 μ mol TE/100 mL と最も低く、抽出温度の上昇とともに活性が高くなった。100℃ 30 分の抽出において 119.7 μ mol TE/100 mL と最も高い活性を示した。ORAC 値は 40℃ 10 分の抽出において 265.5 μ mol TE/100 mL と最も低く、抽出温度の上昇とともに値が高くなった。100℃ 30 分の抽出において 295.6 μ mol TE/100 mL と最も高い値を示した。次に枯節だしの測定結果を図 2 に示した。DPPH ラジカル消去活性は荒節と同様、40℃ 10 分の抽出において 62.7 μ mol TE/100 mL と最も低く、抽出温度の上昇とともに活性が高くなった。100℃ 30 分の抽出において 76.1 μ mol TE/100 mL と最も高い活性を示した。ORAC 値も荒節と同様、40℃ 10 分の抽出で 233.0 μ mol TE/100 mL と最も低く、抽出温度の上昇とともに値が高くなった。100℃ 30 分の抽出において 275.0 μ mol TE/100 mL と最も高い値を示した。また、DPPH ラジカル消去活性、ORAC 値ともに、荒節だしのほうが枯節だしよりもいずれの条件下でも高かった。

荒節だしにおける DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の相関係数は $r=0.963$ (図 3)、枯節だしでは $r=0.938$ (図 4) の正の相関性が見られた。

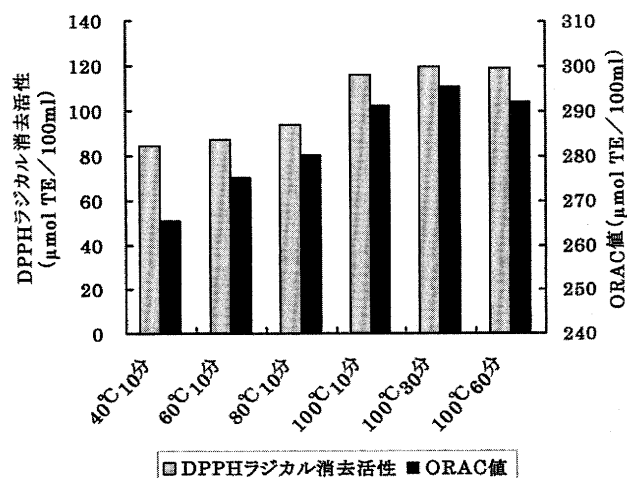


図 1. 荒節だしの各抽出条件における DPPH ラジカル消去活性および ORAC 値

鰹だしおよび各種だしにおける DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の相関性の検討

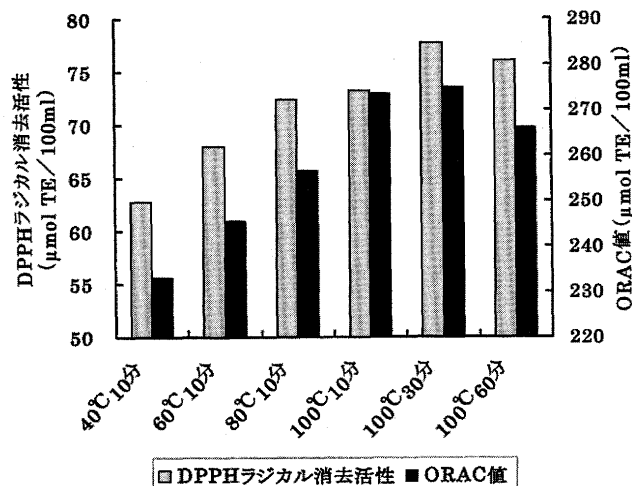


図2. 枯節だしの各抽出条件における DPPH ラジカル消去活性および ORAC 値

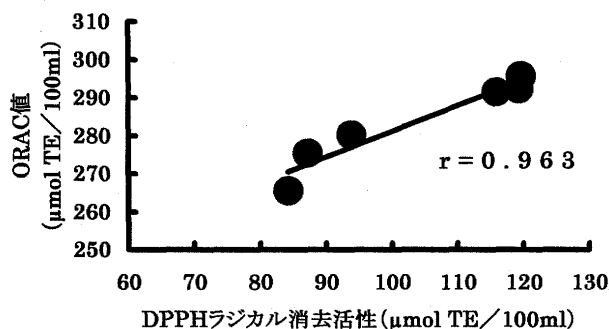


図3. 荒節だしの DPPH ラジカル消去活性および ORAC 値の相関性

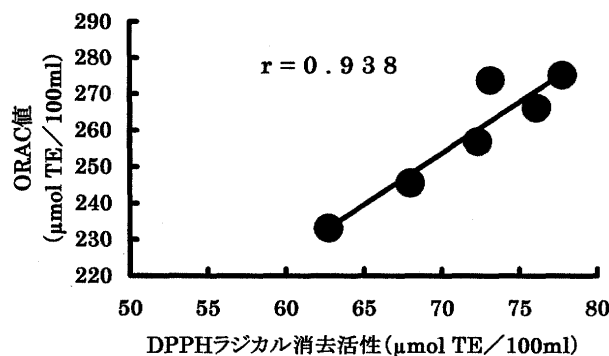


図4. 枯節だしの DPPH ラジカル消去活性および ORAC 値の相関性

(2) 各種だしの DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値ならびに両測定値の相関性

鰹だしについて、DPPH ラジカル消去活性と ORAC に正の相関性が見られたため、さらに対象を広げ、わが国で伝統的に用いられている煮干し、昆布、椎茸の各種だしについても測定した。表1から明らかなように、DPPH ラジカル消去活性、ORAC 値ともに煮干しだしが最も低くそれぞれ 20.2 μmol TE/100 mL, 51.4 μmol TE/100 mL,

表1. 各種だしの DPPH ラジカル消去活性および ORAC 値

だし	DPPH ラジカル消去活性	ORAC 値
煮干し	20.2	51.4
昆布	87.1	142.7
椎茸	97.0	216.6

(単位: μmol TE/100 ml)

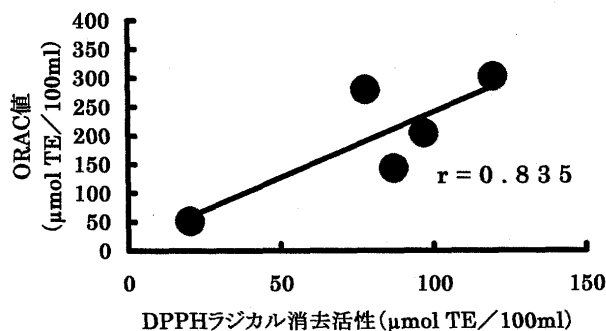


図5. 各種だしの DPPH ラジカル消去活性および ORAC 値の相関性

椎茸だしが最も高くそれぞれ 97.0 μmol TE/100 mL, 216.6 μmol TE/100 mL, 昆布はその中間の 87.1 μmol TE/100 mL, 142.7 μmol TE/100 mL であった。鰹だしにこれら3種類を含めただしについて DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値の相関係数を求めたところ、図5に示すように $r=0.835$ の正の相関性が見られた。

考 察

食品の抗酸化能の評価については測定原理が異なるさまざまな方法が提案されている。中でも DPPH ラジカル消去活性を抗酸化能として評価する方法は、特殊な測定機器を必要としない分光学的測定法であること、短時間での測定が可能であることから汎用されている。島村らは、DPPH ラジカル消去活性法が単一化合物酸化防止剤の抗酸化能の測定法として高い精度を示すことを報告している¹⁸⁾。

一方、新たな指標として ORAC が米国を中心として注目されている。本研究では様々な抽出条件における荒節だしと枯節だしの ORAC 値を測定した。次に DPPH ラジカル消去活性の挙動と比較した。さらに、各種だしを対象を広げ、DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値を測定し、両測定値を比較した。その結果、鰹節、煮干し、昆布、椎茸を含む“和風だし”の範疇において、DPPH ラジカル消去活性は ORAC 値をよく反映することが示唆された。我々はこれまでに鰹だしの DPPH ラジカル消去活性成分がフェノール系物質¹²⁾ やクレアチニン¹⁹⁾ であることを報告してきたが、DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値に正の相関がみられたことから、ORAC においてもこれらの物質

が関与している成分であることが示唆された。

しかし、化合物によっては DPPH ラジカル消去活性との反応性の差異が報告されている。例えば、イソフラボンの一種であるゲニステインでは、DPPH ラジカル消去活性が極めて低い活性であったが、ORAC 法ではカフェ酸と同等の抗酸化能が示されている²⁰⁾。また、ニクズク科香辛料に含まれるリグナンの中に、DPPH ラジカル消去活性で高い活性を示したリグナンの化学形が、ORAC 法では他のリグナンの化学形より低い値を示す傾向であることが報告されている²¹⁾。我々も鰹節中の抗酸化成分として知られているアンセリンは、DPPH ラジカル消去活性が低いことを検証している。また、大澤は ORAC 法だけで抗酸化能を網羅することは難しいと推定しており、同一の標準品を用いた ORAC 法と他の抗酸化能測定法との間の相関性を確認し、その換算係数をもって算出された抗酸化能を参考値として利用することを検討している²²⁾。今後、さまざまな化合物や食品における ORAC 法と他の抗酸化能測定法との相関性についての知見の蓄積が必要と考える。

要 約

様々な抽出条件における荒節だしと枯節だしの ORAC 値を測定し、DPPH ラジカル消去活性との相関性を検討した。さらに、各種だしに対象を広げ、DPPH ラジカル消去活性と ORAC 値を測定し、両測定値を比較した。

各抽出温度および時間における ORAC 値は、荒節だし、枯節だしともに 40℃ 10 分の抽出で最も低かった。抽出温度の上昇とともに値が高くなり、100℃ 30 分の抽出において最も高い値を示した。いずれの抽出条件においても、荒節だしのほうが枯節だしよりも常に高い ORAC 値を示した。DPPH ラジカル消去活性も ORAC 値と同様の挙動を示し、両測定値について、荒節だしでは $r=0.963$ 、枯節だしでは $r=0.938$ の正の相関性が見られた。さらに対象を煮干し、昆布、椎茸の各種だしに広げて測定した結果、DPPH ラジカル消去活性、ORAC 値ともに煮干しだしが最も低く、椎茸だしが最も高い値を示した。鰹だしにこれら 3 種類を含めただしの両測定値について $r=0.835$ の正の相関性が見られた。

文 献

- 1) 村本光二 (2005), 抗酸化ペプチド, 食品加工技術, **25**, 48-51
- 2) Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005), Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302
- 3) Noda, Y., Anzai, K., Mori, A., Kohno, M., Shinmei, M. and Packer, L. (1997), Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR 30 ESR system, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 35-44
- 4) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木征吉 (1994), 各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定, 日食工誌, **41**, 611-618
- 5) 永塚規衣, 原田和樹, 安藤真美, 長尾慶子 (2007), 化学発光 (ケミルミネッセンス) 法による醤油添加 “煮こごり” のラジカル捕捉活性効果, 日調科誌, **40**, 179-183
- 6) 石渡仁子, 山口智子, 高村仁知, 的場輝佳 (2006), 種々の乳製品のラジカル捕捉活性, 日調科誌, **39**, 267-270
- 7) Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terao, J. (1998), HPLC method for evaluation of the free radical scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1201-1204
- 8) Cao, G., Alessio, H. M. and Cutler, R. G. (1993), Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radical Biology and Medicine*, **14**, 303-311
- 9) Ou, B., Hampsch-Woodill, M. and Prior, R. L. (2001), Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4619-4626
- 10) Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. and Prior, R. L. (2004), Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4026-4037
- 11) 原田和樹, 長谷川喜朗, 前田俊道, 北尾悟, 安藤真美, 田村良行 (2008), 日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨集, 291
- 12) 山田潤, 五十嵐圭里, 松田秀喜 (2008), 荒節だしと枯節だしのラジカル消去活性に関する検証, 日調科誌, **41**, 134-137
- 13) 平田裕子, 脇田美佳, 長野美根, 畑江敬子, 島田淳子 (1989), 煮干しだし汁の嗜好性および溶出成分に及ぼす調製条件の影響, 家政誌, **40**, 891-895
- 14) 甲田道子, 松本伸子 (1990), こんぶだし汁の調製法と調理適性, 調理科学, **23**, 302-306
- 15) 東口みづか, 佐々木弘子, 松本伸子, 菅原龍幸 (2005), 精進出し汁の呈味特性と調理適性, 食生活学会誌, **15**, 253-260
- 16) Huang, D., Ou, B. and Hampsch-Woodill, M. (2002), High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4437-4444
- 17) Mikami, I., Yamaguchi, M., Shinmoto, H. and Tsushida, T. (2009), Development and validation of a microplate-based β -carotene bleaching assay and comparison of antioxidant activity (AOA) in several crops measured by β -carotene bleaching, DPPH and ORAC assays, *Food Sci. Technol. Res.*, **15**, 171-178
- 18) 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 (2007), 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
- 19) 山田潤, 赤堀雄介, 松田秀喜 (2009), 鰹だしの抗酸化活性成分の同定, 食科工, **56**, 223-228
- 20) 沖智之, 竹林純, 山崎光司, 佐藤麻紀, 須田郁夫 (2008), 日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨集, 160
- 21) 秋山香代, 中谷延二, 中谷和世, 菊崎泰枝 (2008), 日本食品科学工学会第 55 回講演集, 260
- 22) 大澤俊彦 (2008), 食品機能評価におけるバイオマーカーの重要性, 日薬理誌, **132**, 140-144

(平成 21 年 6 月 29 日受付, 平成 22 年 1 月 13 日受理)

和文抄録

荒節だしと枯節だしの ORAC 値をさまざまな抽出温度、抽出時間で測定した。荒節だし、枯節だしともに抽出温度の上昇とともに値が高くなり、100℃ 30 分の抽出で最も高い値を示した。いずれの抽出条件においても荒節だしのほうが枯節だしよりも常に高い値を示した。DPPH ラジカル消去活性も ORAC 値と同様の挙動を示し、両測定値に正の相関性が見られた。さらに煮干し、昆布、椎茸の各種だしに対象を広げて測定した。DPPH ラジカル消去活性、ORAC 値ともに煮干しだしが最も低く、椎茸だしが最も高い値を示した。鰹だしにこれら 3 種類を含めただしの両測定値に正の相関性が見られた。