

抗酸化活性測定法（FRAP 法）の FIA への展開 — 応答曲面法による最適化 —

高知大学農学部 島村 智子

食品成分の示す代表的な機能性の一つとして、フリーラジカルや活性酸素種による酸化的損傷を防ぐ抗酸化活性が挙げられる。その抗酸化活性の評価法も種々提案されており、2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 法、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法、フォーリン・チオカルト法などが広く用いられている。また、抗酸化活性測定法の一つとして、ferric ions reducing antioxidant power (FRAP) 法も汎用されている。Martins ら¹⁾ は、FRAP 法を FIA へ展開するにあたり、応答曲面法 (Response Surface Methodology) を用いて測定条件 (キャリアーの流速、サンプル及び試薬ループの長さ、リアクターの長さ) の最適化を行った。FRAP 法は、 Fe^{3+} -2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) complex が抗酸化物質存在下で還元された際、生成した Fe^{2+} -TPTZ complex が波長 595 nm の吸収を示すことを利用した方法である。応答曲面法は、可能な限り少ない測定データを用いて、最適解を求めるための数学・統計的組み合わせ手法であり、近年、食品工業の場においても製造プロセスの最適化研究などに利用されているものである²⁾。

本論文で用いられた FIA システムの構成は比較的単純であり、一定量の FRAP 溶液 (0.3 mol/L 酢酸緩衝液 : 10 mmol/L TPTZ : 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ = 5:1:1) と試料溶液がそれぞれ別流路でキャリアー (水) と共に流れ、Y 字路で合流し、その後リアクター、検出器 (波長 595 nm) へと流れるというものであった。

キャリアーの流速 (x_1)、サンプル及び試薬ループの長さ (x_2)、リアクターの長さ (x_3) を変動因子として応答関数を求め、さらに応答曲面から下記の最適条件を決定した：キャリアーの流速 (x_1) = 1.0 mL/min、サンプル及び試薬ループの長さ (x_2) = 18.2 cm、リアクターの長さ (x_3)

= 210.1 cm。実際に最適化条件下で標準物質 FeSO_4 を用いて Fe^{2+} の検出感度等の検討を行った結果、検出限界は 28.6 $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$ 、定量限界は 86.8 $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$ 、変動係数 ($n = 10$) は 1.27% との結果が得られた。さらに、1 時間あたり 30 検体の測定が可能であった。

各種お茶試料の抗酸化活性 (total antioxidant activity: mmol/L Fe^{2+}) を FRAP 法の従来法であるバッチ法と今回最適化した FIA 法で測定した結果 (下表)、両者は良好な一致を示した。

表 各種お茶試料の抗酸化活性		
	抗酸化活性 (mmol/L Fe^{2+})	
	従来法 (バッチ法)	FIA 法
マテ茶	8.81±0.44	9.94±0.03
カモミール茶	1.40±0.01	1.87±0.03
レモングラス茶	2.03±0.02	2.50±0.01
白茶	16.95±0.32	17.10±0.06
紅茶	15.44±0.46	12.20±0.02
緑茶	28.60±0.29	29.40±0.31

一般的に測定条件の最適化は、ある条件下でひとつの因子を変動させ、それに対する応答の変化を調べることを繰り返して決定される。本論文では、その最適化に数学・統計的手法を用い、迅速化した点で興味深い。なお、著者らは同様の手法にて DPPH 法の FIA への展開も行い、報告している³⁾。

[1] A.C. Martins, L. Bukman, A. M. M. Vargas, É. O. Barizão, J. C. G. Moraes, J. V. Visentainer, V. C. Alemeida, *Food Chem.*, **138**, 574 (2013).

[2] 柴田真理朗、食科工、60、728 (2013).

[3] L. Bukman, A.C. Martins, É. O. Barizão, J. V. Visentainer, V. C. Alemeida, *Food Anal. Methods*, **6**, 1424 (2013).