

ケミルミネッセンス法による食品抽出液の抗酸化能の測定

中村アツコ 小野かおり¹

数種の野菜，果実など抗酸化能が期待される物質について，ルミノールを用いたケミルミネッセンス法により，過酸化水素から発生させた活性酸素（ヒドロキシラジカル）消去能を，相対発光強度の変化で評価することを試みた結果，有効であった。活性酸素発生法は，酵素法よりフェントン法の方が100倍ほど強い発光量を示し，好ましかった。t-ブチルヒドロキシアニソール，(+)-カテキン，また酸化防止補助剤のL-アスコルビン酸の発光半減濃度（IC₅₀）を求めたところ，それぞれ0.036，0.017および0.12 mol/dm³であり，(+)-カテキンの発光抑制効果が大きかった。今後，食品類についても（IC₅₀）を求め，含有成分と発光消去能即ち抗酸化能の関係について，より良い評価方法を検討する。

キーワード：ルミノール ルミネッセンス法 フェントン反応 活性酸素 発光半減濃度

1. 緒言

食品その他の植物類の抗酸化能については多くの論文があり^{1)~5)}，その測定法・評価も，多種ある⁶⁾。著者は，これまで，DPPHラジカル消去能を用いてきたが^{7), 8)}，今回は，フェントン反応または酵素法により，過酸化水素から発生させたヒドロキシラジカルをルミノールと反応させ，ルミノールの発光量が，ブランクと比べ，どの程度抑制されるかを，ルミネッセンス測定器で測定するケミルミネッセンス法により，活性酸素消去能を評価することを試みた。抗酸化機能を持つ物質として知られているt-ブチルヒドロキシアニソール，(+)-カテキン，また酸化防止補助剤のL-アスコルビン酸の活性酸素消去能を比較し，抗酸化能を期待されている食品についても実験した。

2. 実験方法

2-1 試料の調製

オクラ，黄ニラ，ブロッコリー，バナナ，アボ

ガド，ゴボウは量販店から求め，購入後直ちに用いた。ミョウガは著者の庭から収穫した。これらの100gを裁断し，4分法により適宜必要量を計り取り，乳鉢で磨り潰し，水で定容（10ml）にした。それぞれの秤取質量については，結果の表中に記載した。煎茶は100gあたり400円の静岡産を，飲用に適した濃度に抽出，ココアは自販機から求めた。カリン試料については研究室で調製したもので，カリンジャムは17%，カリンリキュールは20%のカリンを含有している。ゴボウについてのみ10gを10mlのメタノールを加えて磨り潰し，水で100mlにした。それぞれを膜フィルターでろ過し測定試料とした。

t-ブチルヒドロキシアニソール（以下BHA）とL-アスコルビン酸（以下VC）は，和光純薬（株）特級，(+)-カテキン（以下カテキン）は栗田工業（株）クリタ高純度試薬を用いた。

2-2 抗酸化能の測定

ALOKA社製，ルミネッセンスリーダー・AccuFLEX Lumi 400を用い，430nmの発光強度をフォトカウンティング方式により，37℃におけ

家政学部児童学科
1 家政学部家政学科

る相対発光強度 (RLU/sec) を記録した。

(1) フェントン反応による方法手順

〈測定用試薬溶液〉

A 液：塩化コバルト (II) 六水和物 200 mg と
1000 mg の EDTA とを、pH9.0 のホウ酸
緩衝溶液 100 ml に溶かした溶液

B 液：10 mg% ルミノール水溶液

C 液：5 mmol/dm³ 過酸化水素水溶液

〈測定手順〉

① 測定用容器に A 液 200 μl, C 液 50 μl と試料溶液 20 μl を加え、装置の測定室にセットし、2 分後、B 液 100 μl を添加し、瞬時振り混ぜ測定する。

② ブランクとして、試料溶液 20 μl の代わりに水 20 μl を加え同様に測定する。

(2) 酵素法による方法手順

塩化コバルト (II) の代わりに、ペルオキシダーゼを用いて過酸化水素を分解させる。手順は (1) と同様である。

VC 溶液, BHA 溶液, カテキン溶液は、濃度ごと 3 回ずつの測定, 食品試料については 1 回または 3 回の測定した。

(3) 総ポリフェノールの定量

Folin-Denis 法で行った。

3. 結果および考察

A 液と B 液のみによるルミノール自体の発光量の軌跡を図 1 に示した。測定開始後約 75 秒から 100 秒にかけて最大に達したことから、80 ~ 120 秒間の発光積算値を基に抗酸化能を評価する

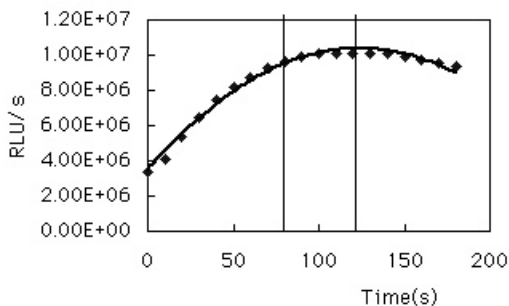


図 1 発光タイムコース

ことにした。

ブランクの発光量積算値 (I_0) と試料の発光量積算値 (I) とから、 $\log(I_0/I)$ を求めることにより、抗酸化能の評価をした。この値が大きいほど発光が消去されたことになり、抗酸化能が大きいと評価できる。

BHA, カテキンおよび VC について、発光消去能の濃度変化を測定し、ブランクの積算発光値が 50% 減少する濃度を IC_{50} として求め、消去能の比較をした。BHA については 1 mg/100 dm³ まで、VC については 5 mg/100 dm³ まで、カテキンについては 2mg/100 dm³ までの希溶液で測定した結果、直線関係が得られた。 IC_{50} の結果を、容量モルに換算して表 1 に示した。

$$IC_{50} = \log(I_0/I) = 0.3010$$

表 1 発光消去能の比較

物質名	BHA	カテキン	VC
IC_{50} (mol/dm ³)	0.036	0.017	0.12

カテキンの IC_{50} が小さいのは、1 分子中にラジカルを補足できるフェノール性ヒドロキシ基を複数もつ物質であるからと考えられる。

フェントン法による結果を、表 2-1, 表 2-2 に示した。実験日時の違いによりブランク発光量が異なったため、表を 2 つにした。酵素法による結果は表 3 に示したが、フェントン法の方が、発光量測定値が安定しており、好ましいと考えられる。酵素法では発生する活性酸素種がヒドロキシラジカルとは限らないようであるが、ルミノールは反応する活性酸素種の選択性が低いので発光消去は起きる。

抗酸化物質として知られている、カテキン、BHA はこの方法でも、抗酸化能が高いと評価できた。⁷⁾

VC は補助剤としての効果はあっても自身での酸化防止効果は 2 者に比べ小さい。

$\log(I_0/I)$ の値で比べてみると、オクラとブロッコリーは 0.06 ~ 0.04% カテキン溶液に相当する抗酸化能があるようであるが、黄ニラの抗酸化能は小さい。ゴボウとカリンはポリフェノール類含量が高い食品として知られているが、この方法で

も高い $\log(I_0/I)$ を示した。その他の試料においても、抗酸化効果が認められた。

生ゴボウと生カリンの総ポリフェノール含量はそれぞれ 135 mg/100 g および 820 mg/100 g であったので、高い抗酸化能はポリフェノール類によるといえるであろう。BHA 溶液と比べたときの、発光抑制率を求め表 4 に示した。

表2-1 発光量積算値および活性酸素消去能
(ブランク発光量積算値 $I_0=4.39E+08$)

試料		発光量積算値(I)	I_0/I	$\log(I_0/I)$
0.08%カテキン溶液	20 μ l	4.06E+05	1.08E+03	3.03
	15 μ l	6.62E+05	6.64E+02	2.82
	10 μ l	1.43E+06	3.07E+02	2.49
	5 μ l	3.32E+06	1.32E+02	2.12
オクラ(3 g/10 ml)	20 μ l	1.02E+06	4.84E+02	2.68
黄ニラ(3 g/10 ml)	20 μ l	8.14E+07	5.40E+00	0.73
ブロッコリー(3 g/10 ml)	20 μ l	1.09E+06	4.03E+02	2.61

表2-2 発光量積算値および活性酸素消去能
(ブランク発光量積算値 $I_0=2.99E+08$)

試料		発光量積算値(I)	I_0/I	$\log(I_0/I)$
0.18%ビタミンC溶液	20 μ l	1.73E+03	1.73E+05	5.24
	5 μ l	2.10E+04	1.42E+04	4.15
ミョウガ(3 g/10 ml)	20 μ l	4.67E+06	6.40E+01	1.81
バナナ(5 g/10 ml)	20 μ l	2.40E+06	1.25E+02	2.10
アボガド(8.6 g/10 ml)	20 μ l	1.51E+05	1.98E+03	3.30
煎茶(5 g/100 ml)	20 μ l	2.88E+06	1.04E+02	2.02
缶ココア(F社)	20 μ l	6.35E+05	4.71E+02	2.67

表3 発光量積算値および活性酸素消去能
(ブランク発光量積算値 $I_0=1.81E+08$)

試料		発光量積算値(I)	I_0/I	$\log(I_0/I)$
0.005% BHA溶液	20 μ l	3.40E+03	5.32E+04	4.73
	10 μ l	4.38E+03	4.13E+04	4.62
ゴボウ(10 g/100 ml)	生 ℓ	6.35E+03	2.85E+04	4.45
	茹で	5.20E+03	3.48E+04	4.54
カリン	茹で汁	5.06E+03	3.58E+04	4.55
	ジャム	7.06E+05	2.57E+02	2.41
	03 $\text{\textcircled{R}}$ リキュール	3.95E+03	4.58E+04	4.66
	90 $\text{\textcircled{R}}$ リキュール	4.05E+03	4.47E+04	4.65
	98 $\text{\textcircled{R}}$ リキュール	4.57E+03	3.96E+04	4.60

表4 BHA溶液と比較した発光抑制率(%)

試料	比較溶液	5mg%BHA溶液のとき	2.5mg%BHA溶液のとき
ゴボウ(茹で)		65	84
カリンジャム		0.45	0.57
カリンリキュール		85	111

カリンのリキュールとジャムはカリン含量に大差はないが、リキュールの方が、はるかに発光抑制効果が大きかった。

他の試料溶液に含まれている抗酸化物質の定量をしていないので、それらとの相関関係を検討することは出来ないが、ポリフェノール類と VC に拠るところが大きいのであろう。食品成分表によれば、オクラと黄ニラのビタミン C および水分含量に大差は無く、抗酸化能の 100 倍の差はポリフェノール含量の差であらう。オクラは経験的に褐変し易い野菜であることが知られており、ポリフェノールを多く含むとされている。

今回は、試みとして行った結果なので、食品試料は、1 回のみでの測定結果であり、ノートとして報告したが、今後、抗酸化能の比較には、各試料とも数回の濃度変化実験を行い、 IC_{50} と成分の分析値とを関連付けたい。

フェントン試薬による発光をカテキンが錯体形成により阻害しないか否かを酵素法と比較することにより検討する必要もある。

参考のため、BHA についての IC_{50} を求めた際の、データを表 5 に示しておく。カテキンおよび VC に関しても同様である。

表5 BHAのRLUの濃度変化と抗酸化能

RLU	濃度 (mg/100 ml)	0.125	0.250	0.500	1.000	1.750
I_0		3.99E+08 \pm 0.12E+08				
$I = (I_{120} - I_{50})$		3.54E+08 \pm 0.06E+08	2.98E+08 \pm 0.06E+08	2.34E+08 \pm 0.02E+08	1.46E+08 \pm 0.04E+08	0.62E+08 \pm 0.03E+08
I_0/I		1.12	1.34	1.71	2.73	6.54
$\log(I_0/I)$		0.045	0.127	0.230	0.436	0.81

謝辞 カリン、ゴボウの実験にご協力いただきました本学卒業生・滝田奈々子および鳥羽まどかさんに感謝いたします。

文献

- 1) 西堀すき江, 並木和子: 野菜ジュースのスーパーオキシドアニオンラジカル消去能とその加熱処理による変化. 日食科工誌 45: 52-56 (1998)
- 2) 立山千草, 本間伸夫, 並木和子, 内山武夫: 食用花卉に含まれるポリフェノール類含有量と抗酸化

- 活性. 日食科工誌 44: 290-299 (1997)
- 3) 深井洋一, 松澤恒友: ブルーンの成分特性と抗酸化能. 日食科工誌 47: 97-194 (2000)
 - 4) 濱渦康範, 飯島悦子: リンゴの果肉抽出物のポリフェノール組成と抗酸化能. 日食科工誌 46: 645-65 (1999)
 - 5) 寺沢なお子, 山崎希, 福井優美子: ハーブ水抽出成分の抗酸化能. 日食科工誌 48: 99-104 (2001)
 - 6) 安藤真美, 原田和樹, 田村良行: [特集] 茶の機能性 I ケミルミネッセンス法による中国茶浸出液の抗酸化能測定. 食品工業 2002: 3, 30-41
 - 7) 浅田浩二, 中野稔, 柿沼カツ子: 活性酸素測定マニュアル 233-236, 講談社サイエンティフィク (1992)
 - 8) 中村アツコ: ビワポリフェノールの抗酸化作用およびプロシアニジンのイオウ化分解による重合度の測定. 東京家政学院大学紀要, 自然・工学系 44: 5-8 (2004)
 - 9) 中村アツコ: 居住空間における鉢植え植物への LED 照射の効果, 東京家政学院大学紀要, 自然・工学系 45: 17-22 (2006)
-
- (2008.3.28 受付 2008.5.19 受理)