

栗渋の抗酸化活性評価その1 (Fluorescein, Pyrogallol Red 法)

作成者：(独)産業技術総合研究所/四国センター
健康工学研究部門 細川純嗣, 岩橋 均

e-mail: junji-hosokawa@aist.go.jp

h1884@gifu-u.ac.jp

1. 栗について

1. 1 概要

栗（クリ、くり）は、ブナ科クリ属の落葉果実で、世界に9種あり、縄文時代の遺跡である三内丸山遺跡からも数多くの栗が出土している。日本人は古くから栗を栽培し食していたと考えられる。

愛媛県は、古くから栗の生産地であり、茨城県、熊本県に次いで全国第3位の生産量である。また愛媛県内の主要産地である中山地方で栽培された「中山栗」は江戸時代の参勤交代の際に徳川三代将軍家光に献上し賞賛されたとの言い伝えがある。



1. 2 食品あるいは含有成分の機能性

栗の渋皮に含まれるポリフェノールは渋みがあるため加工時に除去されることが多い。しかし、栗渋皮から抽出した栗渋抽出物には、抗酸化物質が含まれていることが知られている。この抗酸化物質の主成分はプロアントシアニジンであると考えられる。そこで抗酸化活性が高いことが知られている栗渋抽出物の抗酸化活性評価法について述べる。



1. 3 プロアントシアニジンを含む食品

プロアントシアニジンはポリフェノールの一

図 1-1 生栗と栗甘露煮 (株)中温提供

種であり、“酸で分解すると赤色のアントシアニジンを生成する”を意味する。またカテキンが重合した縮合型タンニンである。プロアントシアニジンが含まれるとされる食品類は、ブドウの皮、種子、ブルーベリーなどである。

2. 抗酸化活性評価方法について

栗渋皮からの抗酸化物質の抽出方法と UV 可視分光光度計によるラジカル捕捉活性測定方法を述べる。

2. 1 準備する器具など

1. 比重計
2. 恒温水槽
3. 試料ろ過用フィルター
4. ろ過鐘、フィルターホルダー
5. ナス型フラスコ
6. ロータリーエバポレーター
7. 凍結乾燥器
8. Vortex ミキサー
9. マイクロピペット
10. エッペンチューブ
11. ディスポーザブルプラスチックセル(3mL)
12. UV 可視分光光度計 サーモスタットを備えたもの

[試薬]

1. エタノール (和光特級)
2. フルオレセイン(Fluorescein) $C_{20}H_{12}O_5$ (東京化成工業製)
3. ピロガロールレッド(Pyrogallol Red) $C_{19}H_{12}O_8S$ (Sigma)
4. トロロックス(Trolox) $C_{14}H_{18}O_4$ (Sigma)
5. AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) $C_8H_{18}N_6 \cdot 2HCl$ (和光一級)
6. ジメチルスルホキシド (DMSO) $C_2H_6OS_6$ (和光特級)
7. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (和光粉末試薬)
8. アスコルビン酸 (和光特級)

2. 2 栗渋抗酸化物質の抽出方法

1. 栗渋皮 120g を量りとり、99.5%のエタノールを 200mL 加える。
2. 栗渋皮に含まれている水分を利用し、エタノール濃度が 75%になるように栗渋皮を少量追加し調整する。エタノール濃度は比重計で測定する。エタノールが 75%になったら、30°Cで 24h 抽出する。
3. ろ液をメンブランフィルターでろ過する。
4. エバポレーターで濃縮する。
5. 凍結乾燥を行い、粉末にして供する。



図 1-2 栗渋抽出物 (株)中温提供

2. 3 試薬の調製 (用時調製)

(1) 1mM Trolox 溶液 (Trolox は抗酸化物質としての標準試薬)

Trolox は水に難溶性であるため、まず DMSO に溶解させる。

100mM Trolox (25.0mg/mL DMSO)を調製した後、PBS で 100 倍希釈する。

(2) 1mM Fluorescein 溶液、1mM Pyrogallol Red 溶液 (プローブ)

Fluorescein , Pyrogallol Red は水に難溶性であるため、まず DMSO に溶解させる。

10mM Fluorescein (10.0mg/3mL DMSO) を調製した後、PBS 10 倍希釈する。

100mM Pyrogallol Red (40mg/mL DMSO)を調製した後、PBS で 100 倍希釈する。

(3) 500mM AAPH 溶液 (ラジカル開始剤)

AAPH (135.6mg/mL PBS)を調製する。

AAPH は温度感受性があるため、反応直前まで氷冷中に保存する。

(4) 10mM PBS 溶液 (リン酸緩衝生理食塩水)

和光の粉末試薬を MilliQ 水で溶解し 1L にメスアップする。

2. 4 UV 可視分光光度計による分析方法

(1) 測定条件

最終濃度 : 50mM AAPH

10 μ M Fluorescein

30 μ M Pyrogallol Red

波長 : 494nm (Fluorescein)

540nm (Pyrogallol Red)

UV 可視分光光度計 UV-2450 Shimadzu 製。

サーモスタットで 37°C 保持

(2) 測定方法 (測定溶液は 3mL)

① プラスチックセルの中から無傷のものを選び、セルを測定装置にセットし、PBS 溶液を加え、ゼロ合わせを行う。

② 抗酸化物質溶液、プローブ溶液が最終濃度になるように分注する。溶液同士がよく混合するようにマイクロピペットで溶液を吸引、排出を 3 回くらい繰り返す。その際には気泡がセルの壁面に付かないよう注意深く行う。

③ セルに蓋をして 3~5 分保持した後、AAPH 溶液を加えて測定溶液を合計 3mL にした後、同じようにピペットで溶液を吸引、排出を 3 回くらい繰り返し、蓋をして測定を開始する。

(3) 栗渋抗酸化物質の抗酸化性評価方法

ラジカル開始剤 AAPH を添加することによってラジカル反応を開始させる。AAPH を添加するとプローブが徐々に酸化されて蛍光を失う。しかしながら、栗渋抗酸化物質を添加することによってプローブの酸化が抑えられて、蛍光強度（吸光度として測定）の減少に遅延が生じる。このように、2つのプローブを併用することで抗酸化物質の濃度及び活性の評価ができる。

1. プローブとして Fluorescein を用いた場合（抽出物の抗酸化活性測定）。

Fluorescein はフリーラジカルに対する反応性が低いため、栗渋を添加することによって Fluorescein の吸光度の減少に遅延が生じ、明確な誘導期 (lag phase) が観察できる。この吸光度の経時変化を測定する。吸光度の初濃度直線部分と、減少し始めた部分を外挿し交差した時間を lag phase とした。横軸に栗渋濃度、縦軸に lag phase をプロットし、検量線を作成した。標準物質 Trolox を基準にして、抗酸化活性を Trolox Eq で換算した。

2. プローブとして Pyrogallol Red を用いた場合（抽出物の抗酸化相対反応性測定）。

Pyrogallol Red はフリーラジカルに対して反応性が高いため明確な誘導期 (lag phase) は観察できないが、栗渋を添加することで Pyrogallol Red の減少速度が小さくなる。この吸光度の経時変化を測定する。栗渋を添加してから定常状態になった時の速度を減少速度とした。栗渋が共存していない場合の減少速度を R_0 、共存する場合の減少速度を R_{IH} とした。栗渋が共存する場合はしない場合より Pyrogallol Red の減少速度が小さくなり、横軸に Pyrogallol Red の濃度 [PGR] に対する抗酸化物質 [IH] の濃度の割合、縦軸に R_0 / R_{IH} をプロットすると、y 軸の 1 を通る（抗酸化物質の添加なしの時）直線が得られ、その勾配から抗酸化物の相対反応性を知ることができる。

3. 分析例

3.1 Fluorescein をプローブとして用いた栗渋のラジカル捕捉活性の測定例

横軸に抗酸化物質濃度、縦軸に lag phase をプロットし、検量線を作成した。標準物質である Trolox を基準にして抗酸化活性を Trolox Eq (TE) で換算した。

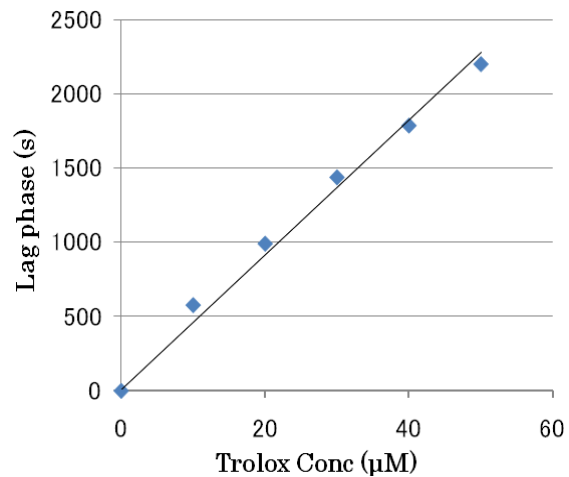
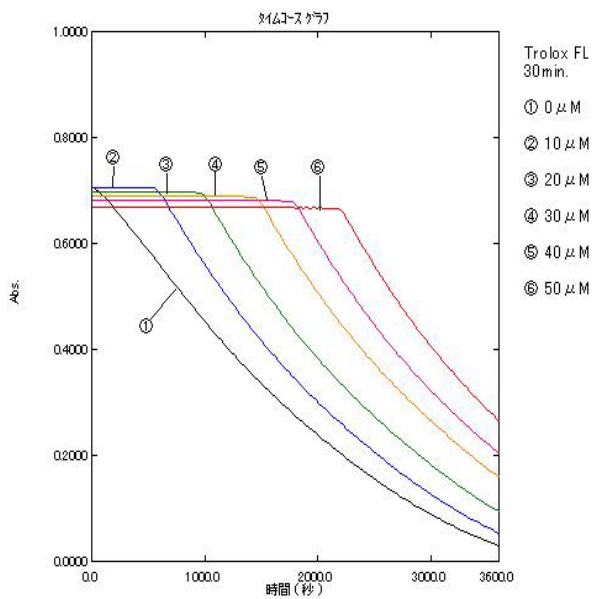


図1. 標準物質 Trolox の Fluorescein 吸光度の経時変化

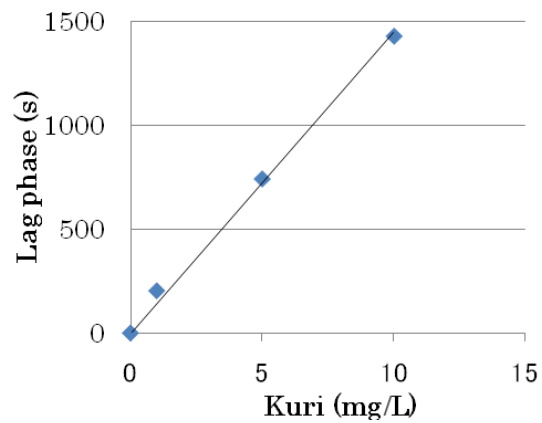
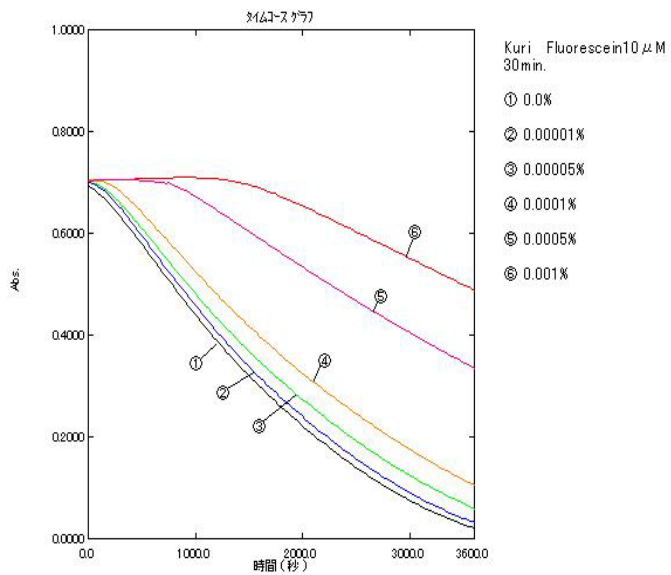


図2. 栗渋抽出物の Fluorescein 吸光度の経時変化

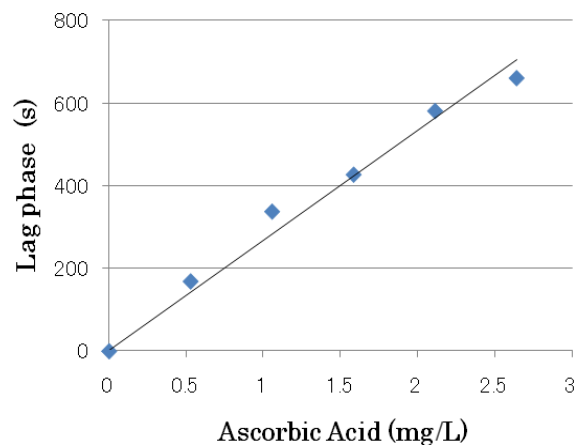
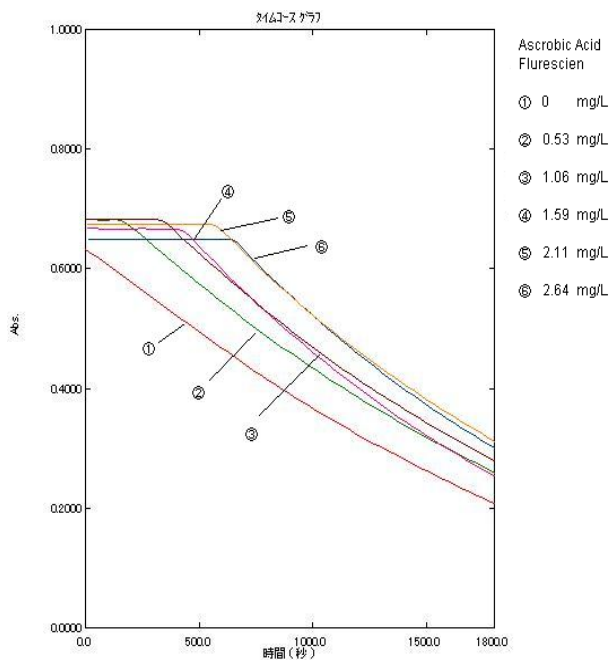


図3. 比較物質アスコルビン酸の Fluorescein 吸光度の経時変化

表1: 明確な誘導期 (lag phase)が観察可能。
検量線から算出した栗渋抽出物、アスコルビン酸の抗酸化活性

試料	抗酸化能 (mmol TE/g)
Trolox (標準物質 FW:250.3)	4.00
栗渋抽出物	3.17
アスコルビン酸(比較物質)	5.86

3. 2 Pyrogallol Red をプローブとして用いた栗渋のラジカル捕捉活性の測定例

横軸に抗酸化物質濃度、縦軸に R_0 / R_{IH} をプロットすると y 軸の 1 を通る直線が得られ、その勾配から抗酸化物の相対反応性を知ることができる。

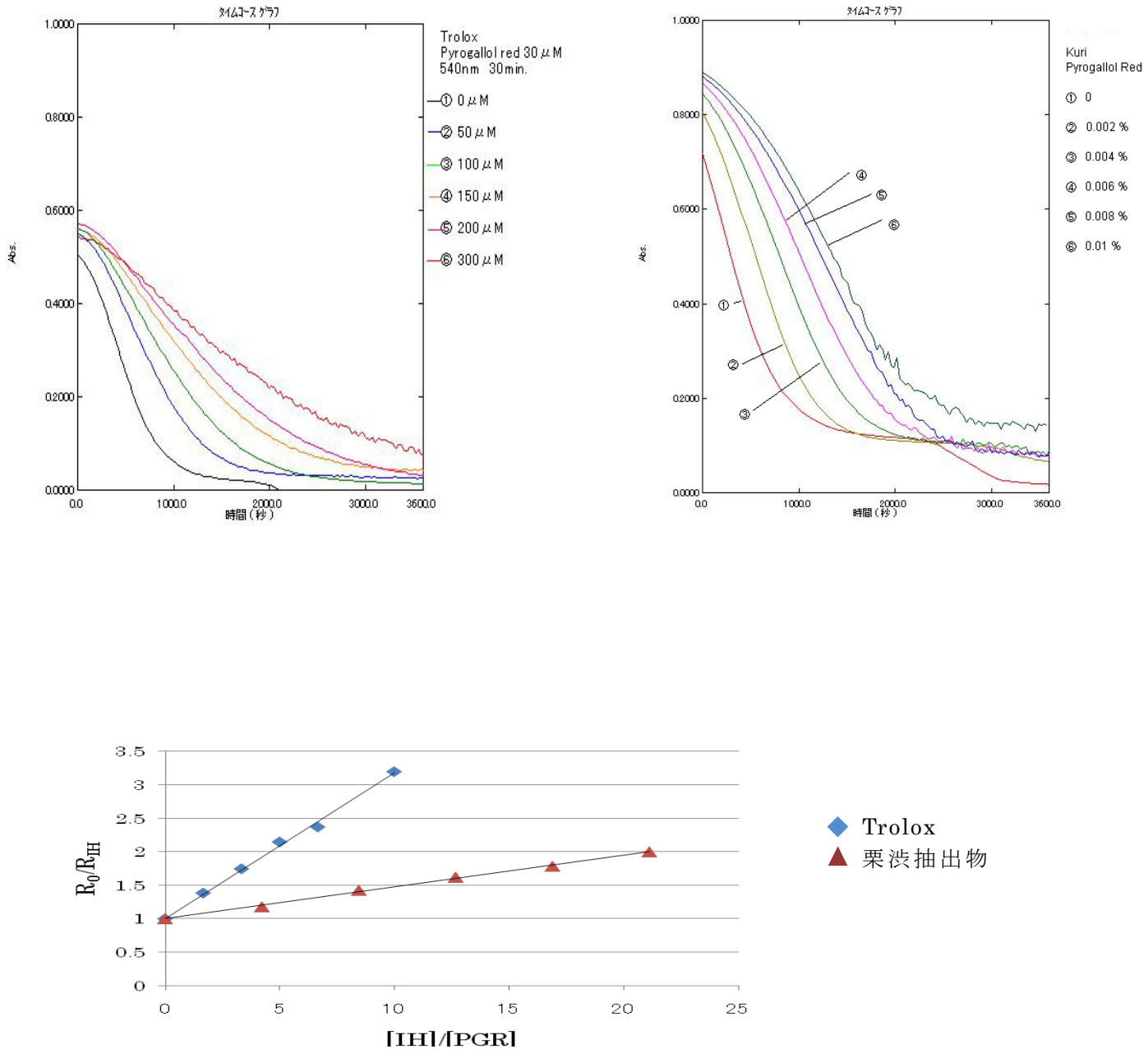


図4. 栗渋抽出物の Pyrogallol Red 吸光度の経時変化

表 2. Trolox の反応性を 1 とした時の栗渋抽出物の反応性結果

試料	相対反応性
Trolox	1.00
栗渋抽出物	0.22

4. 栗渋抽出物の抗酸化性についての分析結果まとめ

標準物質 Trolox に対する栗渋の抗酸化活性及び相対反応性

試料	抗酸化活性 (mmol TE/g)	相対反応性
Trolox (標準物質 FW:250.3)	4.00	1.00
栗渋抽出物	3.17	0.22
アスコルビン酸(比較物質)	5.86	high

栗渋抽出物は混合成分であるにもかかわらず、抗酸化標準物質 Trolox に近い抗酸化活性を有し、抗酸化剤として知られるアスコルビン酸の半分程度の抗酸化活性を示した。栗渋抽出物中にはアスコルビン酸以上の強い抗酸化活性を持つ成分も含まれていると推察される。しかしながら、栗渋抽出物は、抗酸化相対反応性すなわち抗酸化スピードに関しては低いことが認められた。これは持続的で穏やかな抗酸化作用がある可能性があり、食品成分としては都合が良いことが期待される。

5. 分析上の留意、注意点

アスコルビン酸は酸化しやすいので、用事調製を行い速やかに測定する必要がある。

6. その他

特になし。

7. 測定法に関する引用・参考文献

1. 小俣葉、二木鋭雄, 抗酸化物のフリーラジカル捕捉活性評価法,
FRAGRANCE JOURNAL 3, 95-98, 2008

-以上-