

栗渋成分の抗酸化活性評価法その2 (TAC Assay 法)

作成者：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
junji-hosokawa@aist.go.jp

1. 栗について

1. 1 概要

栗は、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

栗渋皮に含まれるポリフェノールは、渋みがあるために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。



図 1-1 生栗と栗甘露煮 (株)中温から提供

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種であり、“酸で分解すると赤色のアントシアニジンを生産する”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。

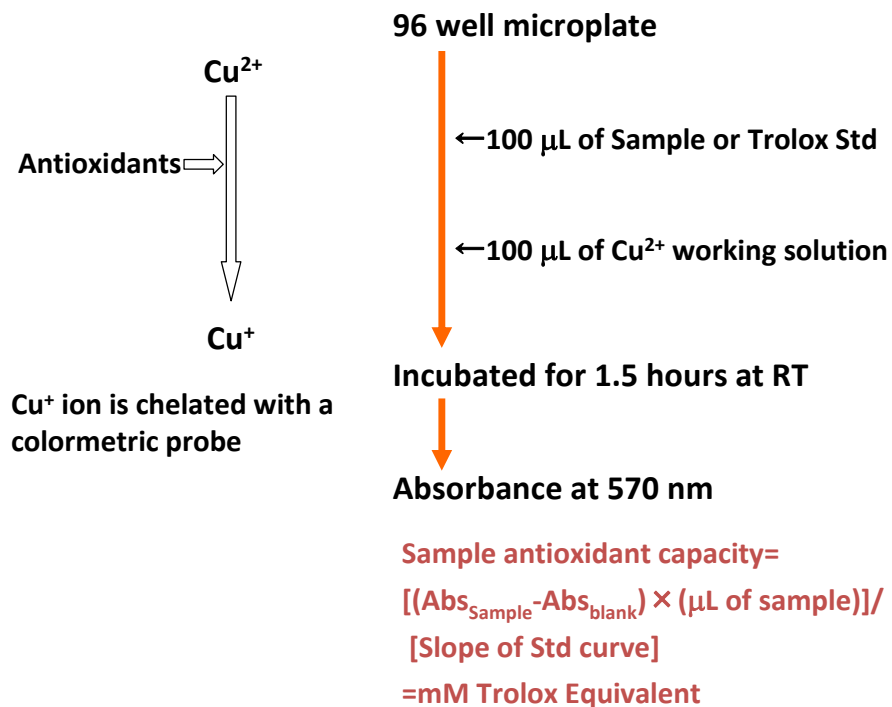


図 1-2 栗渋抽出物 (株)中温から提供

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群の抽出方法と BioVision 社製の Total Antioxidant Capacity(TAC) Assay Kit によるラジカル捕捉活性測定方法を述べる。

(TAC) Assay Kit の活性測定原理の概要は下記のとおりである。



Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit

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. 96 穴プレート、プレートシール
12. プレートリーダー
13. MilliQ 水

[試薬]

1. Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (BioVision)
銅溶液
希釈 Assay
Trolox 標準溶液
2. ジメチルスルホキシド (DMSO) $C_2H_6OS_2$ (Sigma)
3. アスコルビン酸 (和光特級)

2. 2 栗渋中の抗酸化物質群の抽出方法

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。

2. 3 試薬の調製 (用時調製)

(1) 1mM Trolox 溶液 (Trolox は抗酸化標準物質)

Trolox は水に難溶性であるため、まず DMSO に溶解させる。キットに付属の Trolox を 20 μ L DMSO で溶解後、980 μ L MilliQ 水を加えて 1mM Trolox 溶液とする。

2. 4 UV 可視分光光度計による分析方法

(1) 測定条件

波長：570nm

マイクロプレートリーダー 和光純薬工業製

(2) 測定方法（測定溶液は 3mL）

- ① 銅溶液、希釈 Assay は、使用する前に常温に戻す。
- ② 0,4,8,12,16,20nmol の Trolox 標準溶液を調製するために 1mM Trolox 標準溶液を 0,4,8,12,16,20 μ L それぞれの well に分注し、MilliQ 水を加えて合計 100 μ L にする。
- ③ 必要量の銅溶液を希釈 Assay で 50 倍希釈する。
- ④ サンプルを MilliQ 水で希釈して well に 100 μ L 分注する。
- ⑤ ②④の溶液に③の銅希釈溶液を 100 μ L 分注し、合計 200 μ L にする。
- ⑥ 蒸発を防ぐため、96 穴プレートをプレートシールでカバーして常温で 1.5h 静置する。
- ⑦ プレートシールを外し、プレートリーダー(570nm)で吸光度を測定する。

(3) 評価方法

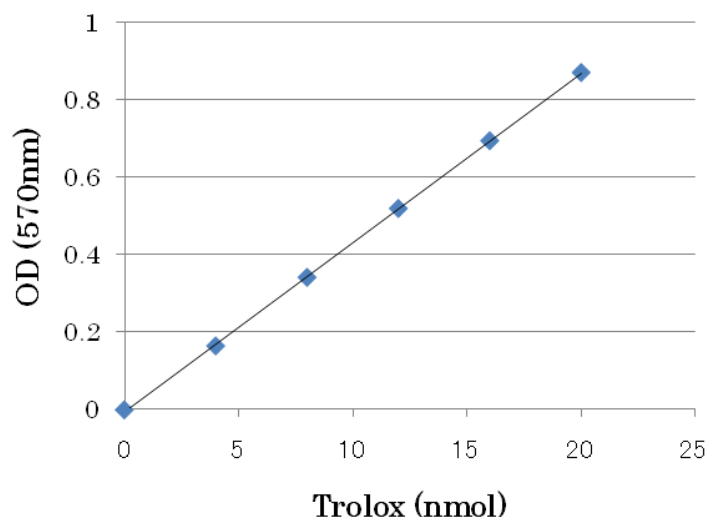
抗酸化物質群によって Cu^{2+} が Cu^{+} に還元されるため、570nm プレートリーダーで吸光度を測定する。抗酸化標準物質である Trolox を基準にして、抗酸化量を Trolox Eq で換算した。また、代表的な抗酸化物質であるアスコルビン酸についても測定を行った。

3. 抗酸化活性の分析例

3. 1 栗渋抽出物、アスコルビン酸のラジカル捕捉活性の測定

横軸に Trolox 濃度、縦軸に吸光度をプロットし、下図の検量線を作成した。

標準物質である Trolox を基準にして抗酸化量を Trolox Eq (TE) で換算した。



栗渋抽出物を濃度 0.0025%に調整して測定したところ吸光度 0.510 であり、検量線から 11.8nmol TroloxEq/100 μ L となり、これは 0.118mmol TroloxEq/L に相当する。したがって、抗酸化活性は $(0.118\text{mmol/L})/(25\text{mg/L})=4.7\text{mmol TE/g}$ となった。

また、アスコルビン酸濃度 0.05mM(0.0009%)の場合の吸光度は 0.594 であった。この吸光度は検量線から 13.7nmol TroloxEq/100 μ L となり、0.137mmol TroloxEq/L に相当した。したがって、抗酸化活性は $(0.137\text{mmol/L})/(8.8\text{mg/L})=15.5\text{mmol TE/g}$ となった。

**検量線から算出した栗渋抽出物とアスコルビン酸の抗酸化活性
(試料の濃度は任意)**

試料	濃度	吸光度	抗酸化活性 (mmol TE/g)
栗渋抽出物	0.0025%	0.510	4.7
アスコルビン酸	0.0009%	0.594	15.5

4. 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。Trolox 標準溶液は-20℃で保存すれば、4ヶ月間使用できる。

5. その他

特になし。

6. 定量法に関する引用・参考文献

-以上-