

I. 実験の基礎技術

1. 機能性成分の分析技術

1) 発芽玄米中の γ -アミノ酪酸(GABA)の分析

(財) 日本穀物検定協会 丸山 浩治

(独) 農研機構 食品総合研究所 津志田 藤二郎

はじめに

γ -アミノ酪酸 (GABA) は非タンパク質構成アミノ酸の一種で、動・植物界に広く分布しており、ヒトでは副交感神経の伝達物質として良く知られている。この物質は、野菜、果物、お茶などおおくの農産物中に含まれており、最近ではさらに、玄米を発芽させ GABA の含量を増大した発芽玄米が市場に流通されつつある。GABA の生理作用としては、血圧降下作用、精神安定作用、腎機能活発化作用などが報告されており、GABA は健康食品や機能性食品に用いる機能性成分として注目されている。

現在、 γ -アミノ酪酸の測定には、アミノ酸自動分析装置による方法、HPLC 法、イオンクロマトグラフィ (IC) 法、GC 法、酵素法等が知られている。これらの中で、O-フタルアルデヒド (OPA) によるプレカラム誘導体化 HPLC 法は、比較的簡便かつ高感度な方法として注目され、緑茶における GABA 含量の測定に用いられている。そこでここでは、発芽玄米中の GABA の汎用分析法として、我々が改良した C₁₈ 逆相カラムを使用したプレカラム誘導体化 HPLC 法について記載する。

準備するもの

1. 実験器具

- 液体クロマトグラフ装置一式 (ポンプ, オートサンプラー, カラムオーブン, デガッサ, グラジエントユニット, 蛍光検出器, データ処理装置等)

試料溶液中に存在するアミノ酸等と GABA を分離させるためグラジエント溶出の可能な装置 (デガッサ (脱気装置), グラジエントユニット) が必要である。検出器は、O-フタルアルデヒドで GABA を蛍光誘導体化するため、蛍光検出器 (FL) を用いる。検出器の波長は、励起波長 350nm, 蛍光波長 450nm とした。分析用カラムは、汎用性から ODS C₁₈ 逆相カラムを用いる。カラムの内径 4.6mm, 長さ 150mm~250mm, 粒子径が 5~10 μ m 程度で分析しうる。カラム劣化防止のため、必ず、同質のガードカラムを用いる。カラム温度は、30~40 $^{\circ}$ C 程度である。5 μ l 注入する為、精度保持の観点からオートサンプラーを使用する。

- ・ 恒温器又は恒温水槽 (誘導体化の際に反応液を 35℃に保持)
- ・ pH メーター (HPLC 用溶出液の pH 調整, 誘導体化反应用緩衝液作成)
- ・ ピペットマン (P-200, P-500, P-1000)
- ・ HPLC 用褐色試料ビン
- ・ 各種容量メスフラスコ (標準溶液の調製等)
- ・ 標準品保存用ガラスビン
- ・ 各種ホールピペット
- ・ 各種メスシリンダー
- ・ パスツールピペット
- ・ シリンジ (2.0ml 容)
- ・ 親水性フィルター (0.22, 0.45 μ m) : 耐アルカリ性のもの
- ・ 小型遠心機
- ・ 超音波装置
- ・ エッペンチューブ : Microcentrifuge Tubes (1.5ml 容)
- ・ 抽出用チューブ : ポリプロピレンチューブ (15ml 容) (17 × 120 mm)
- ・ タイマー
- ・ 粉砕機 (できれば 1.0mm のフィルター使用のものが良い.)

2. 試薬

- ・ γ -アミノ-n-酪酸 (GABA) 標準品 : 含量が明確なもので特級品以上のもの。
 γ -アミノ-n-酪酸 (GABA) を秤量し, 500 μ g/ml を 0.1%リン酸溶液で作成した。これを標準原液として, 各種標準溶液 (1~50 μ g/ml) を 0.1%リン酸溶液で作成した。この溶液を硼酸緩衝液で 2 倍希釈して, 検量線用標準液 (0.5~25 μ g/ml) とする。
- ・ アミノ酸標準溶液 : 各種アミノ酸を 0.1%リン酸溶液で溶解, 希釈する。この溶液を硼酸緩衝液で 2 倍希釈して使用する。
- ・ O-フタルアルデヒド (OPA) (特級品)
32mg を褐色ビンに秤量し, 硼酸緩衝液 2ml を加えて超音波装置で溶解する。溶解後, 2.0ml シリンジに移し 0.45 μ m メンブランフィルターを用いてろ過する。冷蔵庫中で 3~4 日程度は保存可能である。
- ・ 硼酸緩衝液 10.02 \pm 0.02 (25℃) (市販品 : 標準緩衝液 500ml 入, 誘導化体の際に使用。)
- ・ N-アセチル-L-システイン (NAC) (特級品)
26.7mg を秤量し, 硼酸緩衝液 2ml を加えて溶解する。溶解後, 2.0ml シリンジに移し 0.45 μ m メンブランフィルターを用いてろ過する。冷蔵庫中で 3~4 日程度は保存可能である。

- ・メタノール (HPLC 用)
- ・アセトニトリル (HPLC 用)
- ・リン酸二水素カリウム (特級品)
- ・リン酸水素二カリウム (特級品)
- ・10mM リン酸緩衝液 (pH6.8) (HPLC の溶出液として使用。)

100mM リン酸二水素カリウム溶液と 100mM リン酸水素二カリウム溶液を作成する。この溶液を混合して pH6.8 に調整する。この液を使用時に 10 倍希釈した 10mM リン酸緩衝液を HPLC の溶出液として使用する。

移動相 A : アセトニトリルと 10mM リン酸緩衝液 (pH6.8) を体積比で 40 : 60 に混合する。移動相 B : 10mM リン酸緩衝液 (pH6.8)

- ・アジ化ナトリウム (特級品) : 一週間以上 100mM リン酸緩衝液 (pH6.8) を室温にて保存する場合には、1L 当たり 0.2g 加え、超音波装置で溶解する。
- ・リン酸 (生化学用)
0.1% リン酸溶液 : リン酸 1.0g を分取し、蒸留水で 1L とした。(pH2.0)

3. 使用カラム

- 1) ジーエルサイエンス社製 イナートシル ODS 3 (4.6 × 150mm), 粒径 5 μ m
- 2) 資生堂製 カプセルパック C₁₈ (4.6 × 250mm), SG120, 粒径 5 μ m

4. ガードカラム

上記使用カラムと同質のガードカラムを使用する。

プロトコール

1. 試料の調製

- 1) 発芽玄米を粉碎機で粉碎する。(1.0mm フィルターをとおる程度。)
- 2) 抽出用チューブにホールピペットで 0.1% リン酸溶液 10ml を分取する。
- 3) 試料 0.500g を薬包紙に秤量し、チューブ内に入れる。栓をして混和する。(まわりに付着した試料があれば液に浸ける。)
- 4) 水温を 30℃以下に保ちながら、60 分間超音波装置にかける。
- 5) 一夜放置 (室温下, 16~18 時間程度抽出)。
- 6) 抽出用チューブの栓を確認した後、内容物をゆるやかに混合する。(抽出液を均一にするため)
- 7) 1~2 分間静止後、エッペンチューブに抽出液の一定量を分取し、遠心分離 (10krpm, 20 分間) する。
- 8) 上清を他のエッペンチューブに 0.5ml 分取し、硼酸緩衝液 0.5ml 加えて混合する。
- 9) ただちに 2.0ml シリンジに移し、0.22 μ m の親水性フィルター (Millipore 社 :

Millex-GV, PVDF, 25mm) を用いてろ過をし、試料抽出液とする。

2. GABA 標準品と抽出液の OPA 誘導体化

以下の操作は、暗室下で行うことが望ましい。

- 1) NAC 緩衝液 0.3ml を褐色試料ビンに加える。
- 2) GABA 検量線用標準液又は抽出液 0.1ml を褐色試料ビンに加える。
- 3) 混和する。
- 4) OPA 緩衝液 0.2ml を加える。
- 5) 栓をした後、よく混合する。(20 回程度)
- 6) 恒温器又は恒温水槽 (35°C) に入れ、10 分間反応する。
- 7) ただちに 2.0ml シリンジに移し、0.22 μ m 親水性フィルターを用いてろ過する。
(反応液はシリンジで最後まで押し出さないこと。)

※OPA 誘導体化物質は不安定であるため、ろ過後ただちに HPLC に注入する。

3. HPLC による測定

カラム : 上記のカラムを使用

カラム温度 : 40°C

流速 : 1ml / min

注入量 : 5 μ l

検出波長 (FL 検出器) : Ex. 350 nm, Em. 450 nm

< Gradient の条件 >

移動相 : (A) アセトニトリル : 10mM リン酸緩衝液 (pH6.8) (40 : 60) (V/V)

(B) 10mM リン酸緩衝液 (pH6.8)

条件 : 15/85 → 30/70 → 30/70 → 35/65 → 95/5 → 15/85 → 15/85 (A/B)

0 → 30 → 40 → 45 → 50 → 55 → 65 分

1 サイクル : 65 分間

※移動相を作成後、使用前に脱気して使用する方が望ましい。

4. 検量線の作成と計算

上記の条件において HPLC を行い、ピーク高又はピーク面積により定量する。

- 1) GABA 検量線用標準液の数点を誘導体化し、5 μ l HPLC に注入して検量線を作成する。
- 2) 同様に試料を上記のように処理し、5 μ l HPLC に注入する。
- 3) GABA 検量線の式より抽出液 0.1ml 中の含量 X を計算する。
- 4) 試料中の GABA の含量 (A) を計算する。

HPLC の分析値 X (μ g)

含量 (A) = $X \times 10/0.5 \times 1.0/0.1 \times 100/0.500 \times 1/1000 = 40X$

単位 : mg/100g

5. HPLC のクロマトグラム

1) GABA 標準品のクロマトグラム例 (図 1)

2) 発芽玄米について得られたクロマトグラム例 (図 2)

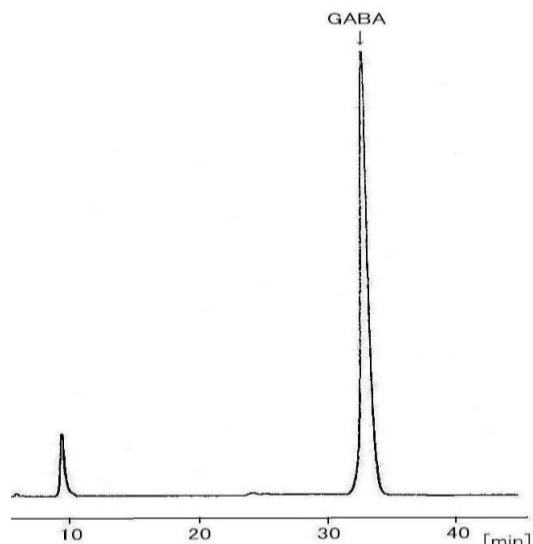


図 1 GABA 標準品のクロマトグラム

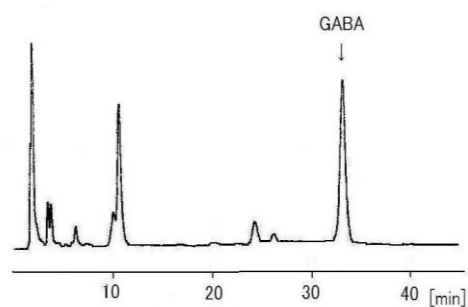


図 2 発芽玄米について得られた
クロマトグラム

6. 同一試料での繰り返し分析 (N=10)

本法での同一試料の繰り返し分析データを下記に示した。

(単位 : mg/100g)

①	23.50
②	22.79
③	22.38
④	23.90
⑤	23.34
⑥	23.11
⑦	22.88
⑧	24.27
⑨	23.69
⑩	23.78

平均値	23.36
分散	0.30
標準偏差	0.55
変動係数	2.34
最大値	24.27
最小値	22.38
範囲	1.89

後片づけ

次の日に続けて使用するのであれば、HPLC カラム内部は移動相 A 及び B でよく洗浄する。しばらく使用しない又はカラム洗浄するのであれば、まず脱塩のため、上記移動相の塩の入っていない移動相を作成し使用する。次に、含水メタノ

ール又はメタノールで洗浄し、カラムをはずして保存する。

おわりに

農産物中の GABA は、最近、機能性成分として注目されており、数種の食品への表示が行われるようになった。特に発芽玄米では、GABA が機能性成分として注目されていることから、その正確な含量表示が望まれている。本法は、玄米中の GABA 含量を簡便に測定することを目的として、従来の方法に改良を加えたものであり、汎用的分析法として活発に利用され、消費者の信頼性確保に貢献することを期待している。

参考文献

- 1) Lindroth, P. and Mopper, K., *Anal. Chem.*, **51**,1667 (1979).
- 2) Buck, R.H. and Krummen K., *J. Chromatogr.*, **315**, 279 (1984).
- 3) Nimura, N. and Kinoshita T., *J. Chromatogr.*, **352**, 169 (1986).
- 4) 島津アプリケーションレポート, No.19, 全自動プレカラム誘導体化法によるアミノ酸の分析 (C190-0102).
- 5) 倉田忠男編集, 新・食品分析法[II], ((社) 日本食品科学工学会, 食品分析研究会, 光琳, 東京), 32-39.
- 6) 高柳博次, 阿南豊正, 池ヶ谷賢次郎, 茶業研究報告, **69**, 29-34 (1989).
- 7) 後藤哲久, 堀江秀樹, 向井俊博, 茶業研究報告, **77**, 29 -33 (1993).
- 8) 財団法人化学物質評価研究機構, アプリケーションレポート, 1057, 玄米中の GABA の分析.
- 9) 岩城啓子, 村松羊子, 北田善三, 日調科誌, **38**, 231-235 (2005).
- 10) 大坪研一編集, 米飯食品ビジネス辞典, (サイエンスフォーラム, 東京), 94-102 (2001).
- 11) 津志田藤二郎, 村井利信, 大森正司, 岡本順子, 農化, **61**, 817-822 (1987).
- 12) 中山致之, 山田嘉隆, 澤井祐典, 食科工, **49**, 188-194 (2002).
- 13) Horie, H., *JARQ*, **34**, 191 (2000).
- 14) 浜田尚樹, 村北宏之, 島津評論, **45**, 183-187 (1988).
- 15) Saikusa, T., Horino, T. and Mori, Y., *J. Agri. Food Chem.*, **42**, 1122 (1994).
- 16) Saikusa, T., Horino, T. and Mori, Y., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2291 (1994).
- 17) 大久長範, 阿部雪子, 秋田県総合食品研究所報告, **1**, 85-86 (1999).

(3) β -カロテン退色法 (リノール酸自動酸化法)

(社) 日本食品科学工学会 三上 一保
(独) 農研機構 食品総合研究所 津志田 藤二郎

はじめに

この方法はリノール酸の自動酸化に伴い生じるリノール酸過酸化物が、 β -カロテンの二重結合と反応することによって、470nm に吸収をもつ黄色を帯びた β -カロテンの色が消失することを利用したものである。リノール酸と β -カロテンに界面活性剤を添加してエマルジョンを形成させ温度を上げることによってリノール酸の自動酸化が促進され、1 時間以内の反応時間でも十分に抗酸化性が測定できる。反応系にサンプルを添加することで吸光度の減少が抑えられ、このことを指標として様々な農作物の抗酸化活性を評価出来る。また、試料液が少量で済む、一度に数点の試料の測定ができる等の特徴をもつ、簡便な方法である。

これまでの手法では、近年、人の健康に及ぼす安全性が問題視され、添加物としての使用が禁止されるようになった合成抗酸化剤、BHA (*tert*-ブチルヒドロキシアニソール) を抗酸化性の標準物質とする例が多かったが、本法では Trolox を標準物質とした評価法を紹介する。

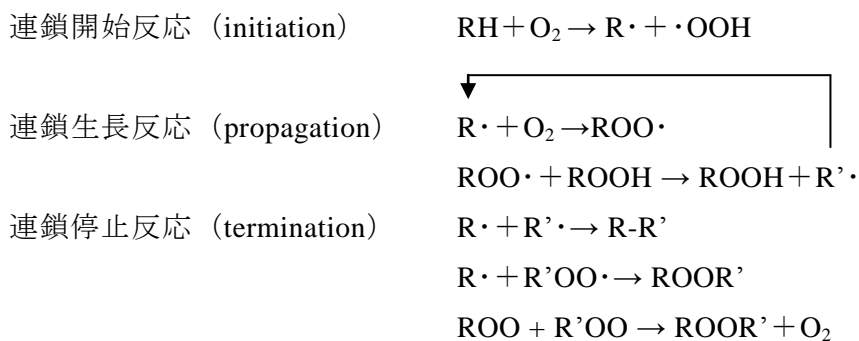


図 1 脂肪酸自動酸化の機構

連鎖開始反応では、脂質分子 (RH) の水素分子 (H) が引き抜かれて脂質ラジカル ($R\cdot$) を発生する。 $R\cdot$ が連鎖的に増えるので自動酸化と呼ばれる。水素の引き抜かれやすさは脂質の構造に起因している¹⁾。

- (i) $ROO\cdot + AH_2 \rightarrow ROOH + AH\cdot$
 $2AH\cdot \rightarrow AH_2 + A$ または $ROO\cdot + AH\cdot \rightarrow ROOH + A$
- (ii) $R\cdot + AH_2 \rightarrow RH + AH\cdot$
 $2AH\cdot \rightarrow AH_2 + A$

図 2 抗酸化物質による脂質の抗酸化の作用機構

AH₂ は抗酸化物質. (i)では抗酸化物質が脂質ペルオキシラジカルに作用して、以降に生じる連鎖生長反応を停止する. すなわち、抗酸化物質が代わって酸化されて脂質ペルオキシラジカルを消去する. (ii)では抗酸化物質が脂質ペルオキシラジカルの生成を阻止する. すなわち、抗酸化物質が生成した脂質ラジカルに水素を与えて反応を停止する¹⁾.

準備するもの

1. 実験器具

- ・分光光度計
- ・ディスポセル (1mL 用)
- ・試験管立て (セルを立てるため)
- ・恒温浴槽 (ウォーターバス)
- ・ドラフト (窒素ガスでクロロホルムを乾かすため.)
- ・褐色メスフラスコ (5mL)
- ・100mL 三角フラスコ
- ・ピペットマン
- ・ピペットマン用チップ

2. 試薬

- ・リノール酸 (和光純薬 等)
- ・β-カロテン (和光純薬 等)
- ・クロロホルム (和光純薬 等)
- ・Trolox (CALBIOCHEM®等)
- ・第 1 リン酸ナトリウム (NaH₂PO₄・2H₂O) (ナカライ等)
- ・第 2 リン酸ナトリウム (Na₂HPO₄・12H₂O) (ナカライ等)
- ・80%エタノール
- ・ツイーン 40 (和光純薬 等)

プロトコール

1. ストック試薬の調製

1) リン酸緩衝液 ; 0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8)

- (1)保存 A 液 ; 0.2M 第 1 リン酸ナトリウム (NaH₂PO₄・2H₂O) 溶液. 27.8g を溶かして 1000mL の溶液を作製.
- (2)保存 B 液 ; 第 2 リン酸ナトリウム (Na₂HPO₄・12H₂O) 溶液. 53.65g を溶かして 1000mL の溶液を作製.

- (3) 保存 A 液及び B 液を混合し、pH6.8 になるように調製する。
- 2) 2mM Trolox (80%エタノールに溶解する。)
2. 試験当日に調製する試薬
- ・ リノール酸溶液 ; 5mL 褐色メスフラスコ使用し、555 μ L のリノール酸(0.9g/mL)をクロロホルムに溶解して 5mL とする。
 - ・ β -カロテン溶液 ; 5mL 褐色メスフラスコ使用し、4mg の β -カロテンをクロロホルムに溶解して 5mL とする。
 - ・ ツイーン 40 溶液 ; 5mL 褐色メスフラスコ使用し、1g のツイーン 40 をクロロホルムに溶解して 5mL とする。
 - ・ Trolox 標準溶液 ; 2mM Trolox ストック溶液を 80%エタノール溶液で希釈し、10~500 μ M の間に 4~6 段階の Trolox 標準溶液を作製する。
3. リノール酸- β -カロテンエマルジョンの作製
- 1) 100mL の三角フラスコにリノール酸溶液を 100 μ L 入れる。
 - 2) β -カロテン溶液を 250 μ L 加える。
 - 3) ツイーン 40 溶液を 500 μ L 加える。
 - 4) ドラフト内において、3) のフラスコに窒素ガスを吹き込み、クロロホルムを完全にとばす。
 - 5) 45mL の蒸留水を加えて溶解する。
 - 6) 5) に溶液に 5mL の 0.2M リン酸緩衝液を加える。
4. 反応液の作製
- 1) 1mL ディスポセルにコントロールとしての蒸留水と 4~6 段階の濃度の Trolox 標準液及び試料液をそれぞれ 20 μ L 採取する。試料液については、2 連にて実施する。従って、セルの通し番号は以下ようになる (以下は試料 3 種類の例)。セル番号 1 はコントロール (蒸留水), 2 は 500 μ M Trolox 溶液, 3 は 250 μ M Trolox 溶液, 4 は 100 μ M Trolox 溶液, 5 は 50 μ M Trolox 溶液, 6 は 25 μ M Trolox 溶液, 7 は 10 μ M Trolox 溶液, 8 と 9 は試料液 1, 10 と 11 は試料液 2, 12 と 13 は試料液 3 となる。
 - 2) 次いで、980 μ L のリノール酸- β -カロテン溶液をピペットマンで勢い良く加える (図 1)。
5. 操作の実際 ; 酸化の促進と吸光度の測定
- 1) 4.2) の後、セル番号 1 (コントロール) の 470nm の吸光度を測定する (A_0)。
 - 2) 直ちに恒温浴槽内の試験管立てに立てる。
 - 3) 次いで 2 番目のセルの吸光度を測定し、同様に恒温浴槽に入れる。
 - 4) 3 番目、4 番目と同様に行い、13 番目まで測定を続ける。

注意点

- * ストップウォッチは 1 番目のセルの吸光度を測定して浴槽に移動した時にスタートさせ、以後 5~10 分おきに約 50 分後までの吸光度の減少を測定する。
- * この方法では、セル番号 1 番から 13 番までの反応時間を揃えるために、常に一定のリズムで吸光度を測定する必要がある。1 番から 13 番までの測定を約 2 分程度で終わるのが望ましい。
- * 吸光度の測定にあたって、セルの外側には浴槽の水が付着するので、測定の際にはセルの周囲の水をすばやくふき取るとよい。

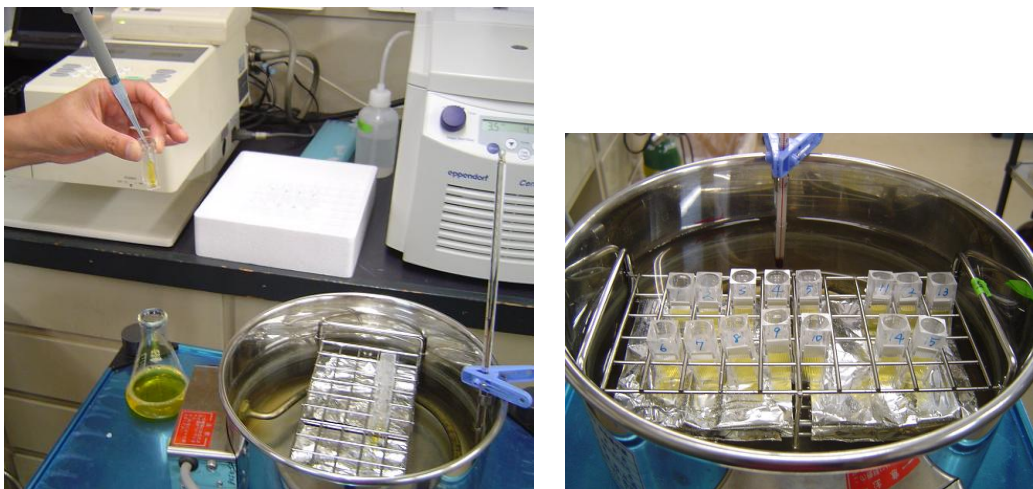


図 1 酸化の促進と吸光度の測定

サンプル及びリノール酸- β -カロテンエマルジョンを入れたセルを 50°C 恒温浴槽内の試験管立てに立てる。

計算方法

1. 試料溶液及び段階希釈した抗酸化性標準物質 Trolox における 15 分及び 45 分後の O.D. 値を用いて $\Delta A = (A_{t1}) - (A_{t2})$ を算出する (O.D.15min - O.D.45min)。
2. Trolox 濃度 (μM) と ΔA の関係を対数グラフにとり (図 3) 直線性が得られる範囲におけるグラフの式を求める。
3. 2. で得られた計算式と 1. における試料の ΔA とより、試料溶液の相対的な抗酸化活性を数値化する。

プロトコールのポイント

- * ΔA の値が少ないものほど抗酸化性が強い。
- * 食品の抗酸化能の一次スクリーニング法として活用できる。
- * リノール酸・ β -カロテン溶液の調製に際しては、 A_0 が Abs 1 程度になるよう β -

カロテン溶液の添加量を調整する。

*本法では 15 分後及び 45 分後の測定値を用いた評価例を示しているが、インキュベート時間 t は、ブランクの A_t が約 4 割程度 (Abs 0.7~0.8 の範囲) 低下するまでの時間とする。

*リノール酸は、イニシエーターとして働くのでやや酸化したものがよい。

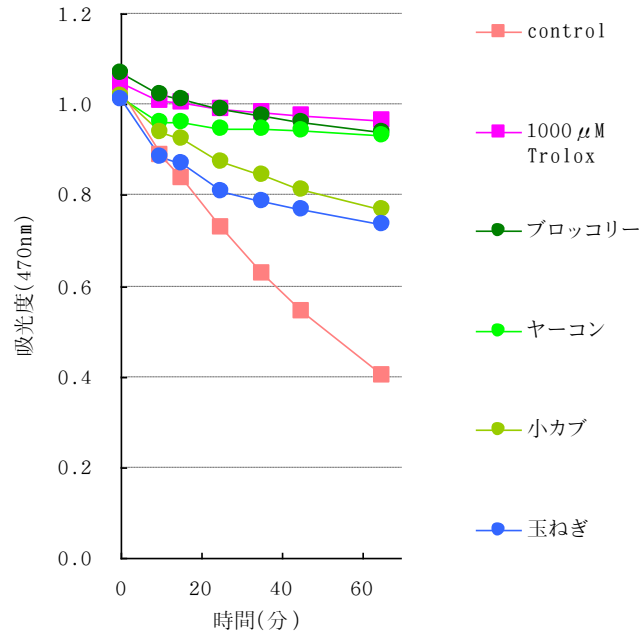


図 2 Trolox 及び様々な野菜抽出物における抗酸化能力の比較 (縦軸は 470nm における吸光度)

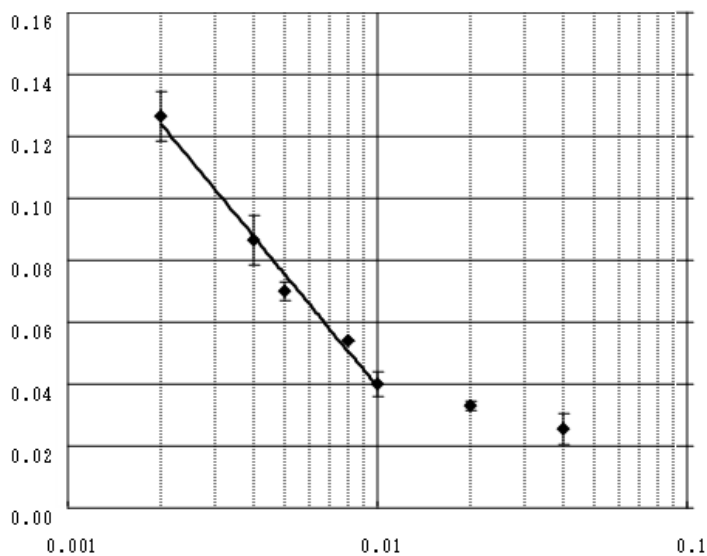


図 3 Trolox 濃度と ΔA の関係 (横軸は μM Trolox 濃度, 縦軸は ΔA)⁴⁾

おわりに

食品工業で広く使われている抗酸化剤の中には、化成品である BHA や BHT など、効力・化学的安定性の点では優れているが、その使用が人の健康に及ぼす安全性が問題視されているものもある。そのため、天然性成分が脚光を集めている。これまでも脂質自動酸化に対する天然抗酸化物質がいくつも見つかっており、植物油に広く存在する α -トコフェノール (ビタミン E)、ゴマ油に存在するセサミノール、ショウガ科ウコン由来のクルクミン等はその例である。合成酸化剤を添加した場合と比較し、効果が劣る・コストが高い等の問題があるものの、人に安全なものであることは今の時代、必須の条件である。

農作物の抗酸化能力を評価する方法としては種々の方法が提案されている。供試試料の性状 (水溶性, エタノール可溶性, 有機溶媒可能性) や測定装置の有無, また, どのような場面 (試験管内, あるいは食品や組織等) で抗酸化能の発揮を期待したいのかを考慮して選択すると良い。ただしこれらには一長一短がある。評価法によっては異なる結果が得られる場合もあるので, 可能ならばメカニズムの異なる複数の評価法で評価することが望ましい。

本項にはセルを用いた手法を示したが, マイクロプレートを使用して測定する方法があるので, 多数の検体を測定する場合には工夫されたい。

参考文献

- 1) 大橋英雄, カバノキ科樹木成分, ジアリルヘプタノイドの抗酸化能とその機能の高度利用, 岐阜大学リポジトリ研究報告書 (1994)。
- 2) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木柁吉, 各種野菜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 (1994)。
- 3) 山本展久, 水江智子, 佐野一成, 高野済, 宮本安紀子, 上野洋子, 工藤恭子, 望月聡, 大分県産フレッシュハーブの特性把握およびその機能性に関する研究—ハーブ類の抗酸化性について—, 大分県産業科学技術センター研究報告, 144-149 (2001)。
- 4) 熊本県食品加工研究所・研究開発課, β -カロテン退色法を利用した簡易な抗酸化能測定法, 九州農業研究成果情報 (1999)。