

I. 実験の基礎技術

1. 機能性成分の分析技術

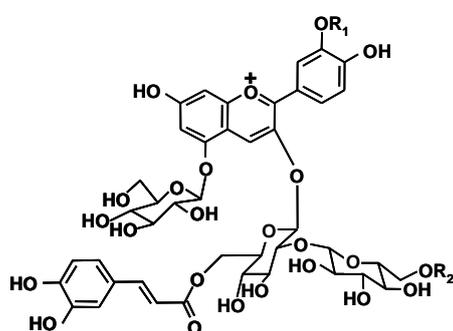
1) 紫サツマイモのアントシアニン分析

九州沖縄農業研究センター 沖 智之

はじめに

紫サツマイモには主要なアントシアニンとして、アグリコンがシアニジンもしくはペオニジンである 8 種のアシル化アントシアニンが存在する (図 1)。一般にアントシアニンを定量する場合、アントシアニンの多くが可視光域 (520nm 付近) において吸収極大を示す特性を利用し、ランベルト・ベールの法則に基づいて分析試料の吸光度を測定した後、標準物質を用いて作成した検量線から総量として定量することが多い。しかしながら、アントシアニンはアグリコンの種類と結合している糖や有機酸の種類により、極大吸収波長やモル吸光係数が異なることから、多様なアントシアニン種が存在する場合は HPLC などの分離手段との組み合わせにより個別に定量することが望ましい。

寺原らは紫サツマイモに含まれる 8 種のアントシアニンの一斉定量法を、大豆イソフラボンの一斉定量に採用されている方法の原理をもとに、確立した¹⁾。本手法では標準物質として紫サツマイモの主要なアントシアニン的一种である YGM-6 (図 1 参照) を用いて、YGM-6 換算で測定後、その値にあらかじめモル吸光係数と分子量から算出した定量係数を乗ずることにより各々のアントシアニンを定量することを可能としている。本項では、紫サツマイモを原材料に用いた加工食品中のアントシアニンの個別定量法について述べる。



	置換基		分子量(M)	定量係数(F)
	R ₁	R ₂		
シアニジン系				
YGM-1a	H	pHb	1055.92	0.999
YGM-1b	H	Caf	1097.96	1.144
YGM-2	H	H	935.82	1.395
YGM-3	H	Fer	1111.99	0.990
ペオニジン系				
YGM-4b	CH ₃	Caf	1111.99	1.115
YGM-5a	CH ₃	pHb	1069.95	1.060
YGM-5b	CH ₃	H	949.84	1.519
YGM-6	CH ₃	Fer	1126.02	1.000

図 1 紫サツマイモに含まれる主要なアントシアニンの化学構造、分子量および定量係数
 分子量はフラビニウム塩として表示。Caf, カフェ酸; Fer, フェルラ酸; pHb, *p*-ヒドロキシ安息香酸 (参考文献¹⁾を引用・改変)

準備するもの

1. 実験器具

- ・分光光度計
 - ※可視光 (532nm) で測定できることが必須
- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) システム
 - 装置構成：送液ポンプ，2 液グラジエントシステム，検出器（可視吸光検出器付）
カラムオープン，デガッサー，データ処理装置
マニュアルインジェクターもしくは冷却機能付オートサンプラー
- ・脱イオン水製造装置
 - (JIS K0557:1998 で規定されるクラス A4 の水を製造可能なこと)
- ・天秤（最小表示値が 0.01mg 以下のもの）
- ・マイクロピペッター
 - 1) プッシュボタン式 (100 μ L, 1mL)
 - 2) ポジティブディスプレイメント式 (250 μ L, 1mL)
 - 3) 耐有機溶媒プッシュボタン式
- ・超音波洗浄器
- ・遠心分離器
- ・ボルテックスミキサー
- ・マグネットスターラー
- ・メスシリンダー (JIS R3505:1994, クラス A)
 - (容量：5mL, 10mL, 50mL, 100mL, 250mL, 1L)
- ・メスフラスコ (JIS R3505:1994, クラス A)
 - (容量：20mL, 25mL)
- ・メジャー瓶
 - (容量：50mL, 1L, 2L)
- ・50mL スクリューキャップ付硬質ガラス製遠沈管
- ・硬質ガラス製バイアル
- ・分注器
- ・フィルター (PVDF 製, 0.45 μ m)
- ・プラスチックディスポーザブルシリンジ (3mL)
- ・HPLC バイアル
- ・マイクロチューブ
 - (容量：1.5mL, 2mL)
- ・ポリプロピレン (PP) 製チューブ
 - (容量：15mL, 50mL)

- ・ PTFE 製攪拌子
- ・ 攪拌子取り出し棒
- ・ 葉さじ
- ・ タイマー
- ・ 耐酸性手袋
- ・ ゴーグル

2. 試薬

- ・ 水
JIS 規格 (K0557:1998) で規定されているクラス A4 のもの (例: MilliQ 水).
- ・ アセトニトリル
高速液体クロマトグラフ用 (CAS No. : 75-05-8)
- ・ ギ酸
特級 (CAS No. : 64-18-6)
- ・ メタノール
特級 (CAS No. : 67-56-1)
- ・ トリフルオロ酢酸
特級 (CAS No. : 76-05-1)
- ・ YGM-6 (純度 97%以上)

現在は市販されていないので Terahara らの論文²⁾を参考に紫サツマイモから単離・精製する。方法の概略は紫サツマイモから得た抽出液から吸着クロマトグラフィー(Diaion HP-20 樹脂), ゲル濾過クロマトグラフィー(Sephadex LH-20 樹脂), 分取ペーパークロマトグラフィー, 分取薄層クロマトグラフィー, 分取高速液体クロマトグラフィーの順に精製を行った後に, エーテルで沈殿させ, 高純度の YGM-6 を得る。得られたアントシアニンは質量分析計 (MS) や核磁気共鳴分光計 (NMR) などを用いて分子量や化学構造の確認を行うとともに, HPLC で純度の検定を行う。単離・精製した YGM-6 は-20℃で保管する。

3. 調製

1) 溶離液 A (水 : ギ酸 = 100 : 0.6)

- (1) 1L メスシリンダーで水 1L を量り取る。
- (2) 2L メジューム瓶に(1)の水を移す。
- (3) 10mL メスシリンダーでギ酸 6mL を量り取る。
- (4) (2)のメジューム瓶に(3)のギ酸を移す。
- (5) (4)のメジューム瓶に攪拌子を入れ, マグネットスターラーを用いて攪拌, 混和する。
- (6) (5)のメジューム瓶から攪拌子取出し棒で攪拌子を取り出す。

※ 溶離液 A は用事調製する。

2) 溶離液 B (アセトニトリル：水：ギ酸=50：50：0.6)

- (1) 250mL メスシリンダーで水 250mL を量り取る。
- (2) 1L メジューム瓶に(1)の水を移す。
- (3) 250mL メスシリンダーでアセトニトリル 250mL を量り取る。
- (4) (2)のメジューム瓶に(3)のアセトニトリルを移す。
- (5) 10mL メスシリンダーでギ酸 3mL を量り取る。
- (6) (4)のメジューム瓶に(5)のギ酸を移す。
- (7) (6)のメジューム瓶に攪拌子を入れ、マグネットスターラーを用いて攪拌、混和する。
- (8) 超音波洗浄器に(7)のメジューム瓶を入れた後、超音波を発生させ、5 分間脱気する。
- (9) 脱気後、メジューム瓶を超音波洗浄器から取り出す。
- (10) (9)のメジューム瓶から攪拌子を取り出す。

※ 溶離液 B は用事調製する。

3) FAW 溶液 (アセトニトリル：水：ギ酸=10：90：0.4)

- (1) 50mL メスシリンダーで水 45mL を量り取る。
- (2) 50mL メジューム瓶に(1)の水を移す。
- (3) 10mL メスシリンダーでアセトニトリル 5mL を量り取る。
- (4) (2)のメジューム瓶に(3)のアセトニトリルを移す。
- (5) ポジティブディスプレイメント式マイクロピペッターでギ酸 200 μ L を量り取る。
- (6) (4)のメジューム瓶に(5)のギ酸を移す。
- (7) (6)のメジューム瓶に攪拌子を入れ、マグネットスターラーを用いて攪拌、混和する。
- (8) (7)のメジューム瓶から攪拌子を取り出す。

4) YGM-6 標準溶液

- (1) 葉さじで YGM-6 (トリフルオロ酢酸塩、純度 97%以上) 1.24mg を硬質ガラス製バイアル (容量 5mL 程度) へ量り取る。
- (2) 1mL ポジティブディスプレイメント式マイクロピペッターで 3) で調製した FAW 溶液 1mL を量り取る。
- (3) (1)のバイアルに(2)の FAW 溶液を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌、溶解する。
- (4) 20mL メスフラスコに(3)の溶液を 1mL プッシュボタン式マイクロピペッターで移す。

- (5) (3)のバイアルを FAW 溶液で共洗いし、洗液を(4)のメスフラスコに移す。
- (6) FAW 溶液で(5)のメスフラスコを 20mL に定容する。
- (7) (6)のメスフラスコに蓋をして、転倒混和により均一な溶液にする。
- (8) (7)の溶液全量を 50mL チューブに移す。
- (9) 1mL プッシュボタン式マイクロピペッターで(8)のチューブから YGM-6 標準溶液を分光光度計用 1mL セル(光路長: 1cm)に移す。
- (10) (9)のセルを分光光度計に設置し、532nm の吸光度を測定し、小数点以下 3 桁まで記録する。
- (11) 100 μ L プッシュボタン式マイクロピペッターで(8)の YGM-6 標準溶液を HPLC バイアルに 100 μ L ずつ分注する。
※ HPLC バイアルへの分注本数が多い場合は、2mL チューブに 1.6mL 程度分注し、冷凍庫(-40 $^{\circ}$ C以下)で保存する。
- (12) (11)のバイアルにセプタムとキャップを取り付け、冷凍庫(-40 $^{\circ}$ C以下)で保存する。
- (13) 下記の式に従い、濃度補正係数(f)を算出する。

$$f = \frac{Es}{c \times \varepsilon} = 0.8065 \times Es$$

f : 濃度補正係数

Es : YGM-6 標準溶液の 532nm における吸光度

ε : YGM-6 の 532nm におけるモル吸光係数 (= 24 800)

c : YGM-6 標準溶液の濃度 (= 50 μ M)

※ 50 μ M YGM-6 標準溶液の理論上の吸光度(Es)は 1.24

5) アントシアニン抽出溶媒

- (1) 100mL メスシリンダーで水 87mL を量り取る。
- (2) 1L メジューム瓶に(1)の水を移す。
- (3) 1L メスシリンダーでメタノール 510mL を量り取る。
- (4) (2)のメジューム瓶に(3)のメタノールを移す。
- (5) 5mL メスシリンダーでトリフルオロ酢酸 3mL を量り取る。
※ 作業は必ずドラフトチャンバー内で行い、耐酸性手袋とゴーグルを着用すること。
※ トリフルオロ酢酸をメスシリンダーに移す時は、耐有機溶媒プッシュボタン式マイクロピペッターを用いること。
- (6) ドラフト内で(4)のメジューム瓶に(5)のトリフルオロ酢酸を移す。
- (7) マグネットスターラーを用いて攪拌、混和する。
※ アントシアニン抽出溶媒は用事調製する。

4. HPLC 分析条件

- ・ カラム：Imtakt 社製 Cadenza CD-C18 (φ4.6mm × 250mm, 粒子径；3μm)
- ・ グラジエント条件：25% (B) →40min→45% (B) →5min→25% (B)
- ・ 移動相流速：0.6mL/min
- ・ カラム温度：30°C
- ・ 検出波長：520nm
- ・ 注入量：10μL

プロトコール

1. 試料の調製

- 1) 葉さじで試料 1g を 50mL スクリューキャップ付硬質ガラス製遠沈管へ量り取る
(量り込み量は 1mg 単位で記録する)。
- 2) 1) の遠沈管へ分注器でアントシアニン抽出溶媒 15mL を添加する。
- 3) 2) の遠沈管をボルテックスミキサーで 30 秒間、攪拌する。
- 4) 水温を 37°C に設定した超音波洗浄器内に 3) の遠沈管を入れた後、超音波を発生させ、5 分間超音波発生下で抽出を行う。
※ 超音波処理の間、遠沈管を振り、2 回懸濁させる (1 分後と 3 分後を目処)。
- 5) 超音波の発生を止め、さらに静置状態で 37°C, 10 分間抽出を行う。
※ 5 分間経過後、ボルテックスミキサーで 30 秒間攪拌する。
- 6) 超音波洗浄器から遠沈管を取り出し、遠心分離 (4550g, 25°C, 10 分間) を行う。
- 7) 遠心分離後、遠沈管から上清を 25mL メスフラスコに移す。
- 8) 残渣の入った遠沈管へ分注器でアントシアニン抽出溶媒 10mL を添加する。
- 9) 8) の遠沈管をボルテックスミキサーで 30 秒間、攪拌する。
- 10) 4) ~ 6) の操作を繰り返す。
- 11) 遠心分離後、遠沈管から上清を、7) で抽出液を入れた 25mL メスフラスコに移す。
- 12) アントシアニン抽出溶媒で 11) のメスフラスコを 25mL に定容する。
- 13) 12) のメスフラスコに蓋をして、転倒混和により均一な溶液にする。
- 14) 13) の抽出液を 15mL チューブに移す。
※ 希釈が必要な場合は、アントシアニン抽出溶媒を用いて適宜行う。
- 15) フィルターを装着したプラスチックディスポーザブルシリンジにプッシュボタン式マイクロピペッターで 14) の試料を移し、濾過を行い、濾液を HPLC 用バイアルに入れる。
- 16) 15) のバイアルにセプタムとキャップを取り付け、HPLC での分析まで 4°C で保管する。

※ 2 日以内に分析を行うこと。

2. HPLC システムの安定化

- 1) 用事調製した溶離液 A と溶離液 B で、カラム前までの HPLC システムの送液ラインを置換する。
- 2) HPLC の初期の状態(溶離液 A : 溶離液 B = 75 : 25) で溶離液を 10 分間程度、送液した後に、試料を注入せずに、グラジエント溶出を 2 回行い、HPLC システムを安定化させる。

3) YGM-6 標準溶液の HPLC 分析

YGM-6 標準溶液を HPLC で分析し、YGM-6 の面積値 (A_s) を求める。

4) 試料の HPLC 分析

検体を YGM-6 標準溶液と同様な HPLC 条件下で分析し、主要なアントシアニン(YGM-1~6) に対応するピーク的面積値 (A_{YGM-x}) を求める。参考に紫サツマイモを原材料に用いた飲料を分析した例を図 2 に示す。

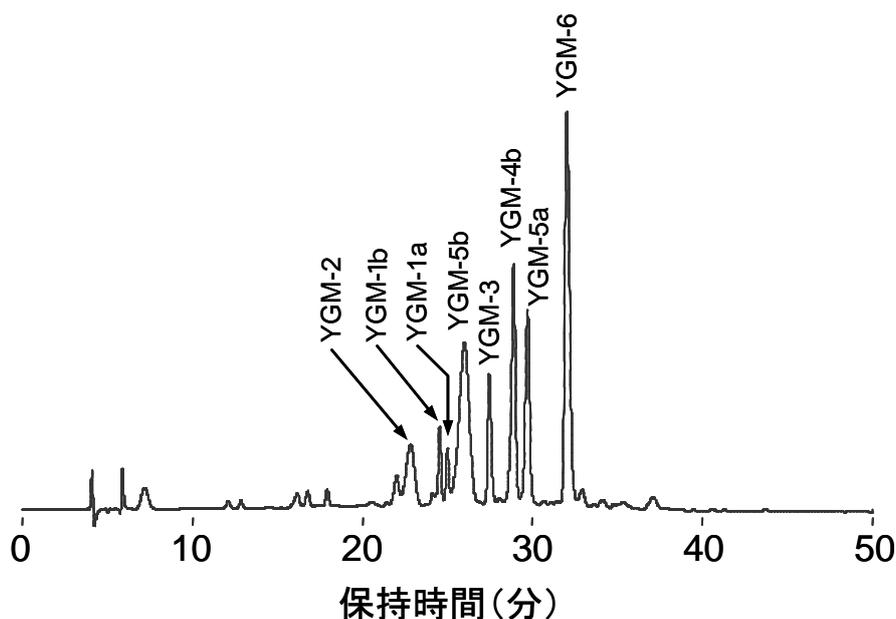


図2 紫サツマイモを原材料に用いた飲料の分析

プロトコールのポイント

1. 50 μ M YGM-6 標準溶液の吸光度 (E_s) は 1.24 ($= 24\,800 \times 50 \times 10^{-6}$) となる。
2. オートサンプラーがない場合は、インジェクターに 10 μ L のサンプルループを装着し、試料注入時における誤差を小さくするようにする。
3. 紫サツマイモに含まれる主要なアントシアニンの標品は市販されていないため、

アントシアニンの定性は質量分析計を用いて行うことが推奨される。また、紫サツマイモそのもの(アヤマラサキ・ムラサキマサリ・アケムラサキなど)や紫サツマイモを主原料であることが確かである飲料を分析し、図 2 の典型的なクロマトグラム例を参照することによって同定することも可能である。

※品種により主要アントシアニンの含有比率が異なる場合がある。

※商品によっては加工工程で主要アントシアニンが分解している場合がある。

4. 紫サツマイモ主要アントシアニンの定量係数は以下の式に従って算出されている。

$$F_x = \frac{A_s}{A_{x50}}$$

A_s : 50 μ M YGM-6 標準溶液のピーク面積

A_{x50} : 試料溶液中の YGM- x のピーク面積

5. 分析対象アントシアニンがアシル体であることから、アントシアニンの抽出溶媒に添加する酸はアントシアニンの構造に変化を与えないトリフルオロ酢酸を用いている。
6. 検体の保管は短期の場合は、遮光下において冷蔵庫で可能であるが、長期の場合は冷凍庫で保管する。

計算方法

試料溶液中の紫サツマイモ主要アントシアニン(YGM-1~6)の各濃度(C_x)は、試料溶液の分析で得られたピーク面積値(A_x)、50 μ M YGM-6 標準溶液のピーク面積(A_s)濃度補正係数(f)、分子量ならびに定量係数(図 1 を参照)を用いて、下記の式から算出する。

$$C_x(\text{mg/L}) = \frac{M_x \times A_x \times f \times F_x}{20 \times A_s}$$

C_x : 試料溶液中の YGM- x ($x=1\sim 6$) の濃度

M_x : YGM- x の分子量(フラビニウムイオンとして)

A_x : 試料溶液中の YGM- x のピーク面積

f : YGM-6 標準溶液の濃度補正係数

F_x : YGM- x の定量係数

A_s : 50 μ M YGM-6 標準溶液のピーク面積

算出して得られた検体中のアントシアニン濃度から、下記の式に従い、100g 当たりの含量として算出する。

$$C'_x (\text{mg} / 100\text{g}) = \frac{C_x \times 2.5}{W}$$

C'_x : 検体 100g 中の YGM- x ($x=1\sim 6$) 含量

C_x : 試料溶液中の YGM- x ($x=1\sim 6$) の濃度

W : 秤量した検体 (g)

後片付け

1. 分析試料の調製などで用いたチップや HPLC 分析の廃液などは所属機関の規定に準じて処理する。
2. チップスなど油分の多い検体を取り扱ったガラス器具は、市販の食器洗い用液体洗剤を用いて油分を洗い流した後に、通常のガラス器具と同様な洗浄を行う。

おわりに

紫サツマイモを原材料に用いた飲料を連続 44 日間摂取した被験者の中には、肝機能の指標値である γ -GTP, GOT, GPT の値が低下する者がいることが報告されている³⁾。また、試験管内や実験動物レベルでの生理機能性もいくつか知られている⁴⁾。これらは紫サツマイモに含まれる特異的な構造を有するアントシアニンに起因すると考えられている。今後、本定量法は紫サツマイモ加工食品中のアントシアニンを定量したり、紫サツマイモの生理機能性を享受するための摂取量を規定したりするなどの場面で活用できる。

参考文献

- 1) 寺原典彦, 沖 智之, 松井利郎, 福井敬一, 杉田浩一, 松本 清, 須田郁夫, 紫甘しょに含まれる主要アントシアニンの一斉定量, 食科工, **54**, 33-38 (2007)。
- 2) Terahara, N., Kato, Y., Nakamura, M., Maitani, T., Yamaguchi, M. and Goda, Y., Six diacylated anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1420-1424 (1999)。
- 3) 須田郁夫, 山川理, 松ヶ野一郷, 杉田浩一, 竹熊宣孝, 入佐孝三, 徳丸文康, 高アントシアニンカンショジュース飲用による血清 γ -GTP, GOT, GPT値の変動, 食科工, **45**, 611-617 (1998)。
- 4) Suda, I., Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y. and Furuta, S., Physiological functionality of purple-fleshed sweet potatoes containing anthocyanins and their utilization in foods. *JARQ*, **37**, 167-173 (2003)。

Ⅱ. 機能性評価実験法

1. 化学反応, 酵素反応を用いた機能性評価

1) 抗酸化性評価法

(1) DPPH ラジカル消去活性評価法

(独) 農研機構 九州沖縄農業研究センター 沖 智之

はじめに

生活習慣病をはじめとする種々の疾病の発症が生体内での活性酸素・フリーラジカルの過剰発生と関連し, これら疾病の発症予防に食品由来の抗酸化物質の摂取が有効であると考えられている. 食品の抗酸化機能を評価する方法としては種々の方法が提案されており, これらには一長一短がある. また評価法によっては結果が一致しない場合もあり, 可能ならば原理の異なる 2 つ以上の評価法で測定することが望まれる.

本項では簡便でかつ特殊な分析機器を要さない, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を用いた評価法 (96 穴プレート法, 試験管法) について述べる. DPPH はそれ自体が安定なラジカルであり, ラジカル消去物質が存在すると非ラジカル体に変化する (図 1). 通常は電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いて残存するラジカルを測定し, 分析試料のラジカル消去活性を求めるが, DPPH はラジカルが消去されると溶液の紫色が次第に退色するために, 分光光度計でもその変化を捉えることが可能である.

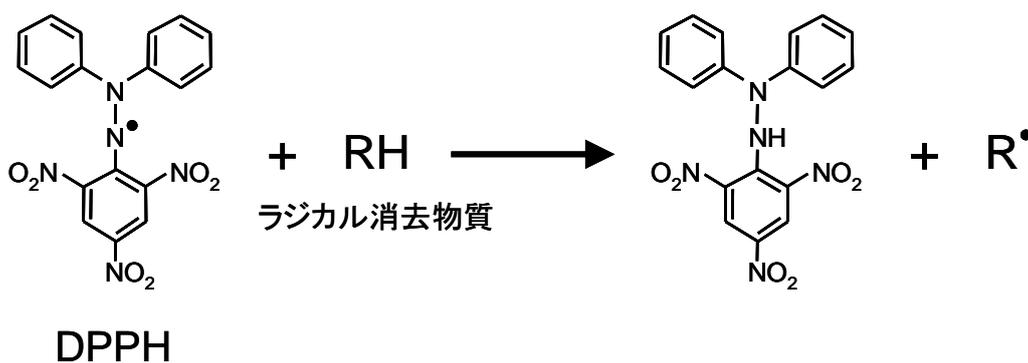


図 1 DPPH とラジカル消去物質との反応スキーム

1. 96 穴プレートを用いた評価法

準備するもの

1) 実験器具

- ・ 96 穴プレート対応プレートリーダー
(520nm で吸光度の測定が可能なこと)
- ・ 96 穴プレート (平底, クリアー, 容量 0.2mL で十分に攪拌できること)
- ・ 分注器
- ・ マルチチャンネル分注器 (12 チャンネル推奨)
- ・ ストップウォッチ
- ・ プレートミキサー
- ・ pH メーター

2) 試薬

(1) 200 mM MES (2-morpholinoethanesulphonic acid) 緩衝液 (pH6.0)

MES (DOJINDO 社製) 42.65 g を 900 mL の脱イオン水に溶解し, 飽和水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 6.0 に調整後, 1L に定容する. MES 緩衝液は冷蔵保存する.

(2) 800 μ M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 溶液

褐色瓶に秤量した DPPH (Wako 社製, 047-04051) 3.15 mg にエタノール (10 mL) を添加後, 回転子を入れ, スターラーで攪拌して溶解する. 溶解は 30 分~1 時間かけて行う. DPPH 溶液は用時調製する.

(3) 50%エタノール水溶液

脱イオン水 (250 mL) にエタノール (250 mL) を加える.

(4) 20%エタノール水溶液

脱イオン水 (400 mL) にエタノール (100 mL) を加える.

(5) Trolox ((\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 溶液

① 1.6 mM Trolox stock solution の調製

Trolox (Aldrich 社製, 238813-1G) 20.02mg を秤量し, 50%エタノール水溶液で溶解後, 50mL に定容する. Trolox stock solution は 100 μ L ずつ分注し, -40°C に保管する.

② 検量線用 Trolox 溶液の調製

1.6 mM Trolox stock solution (100 μ L) に 50%エタノール水溶液 (900 μ L) を添加し, 160 μ M Trolox 溶液を使用直前に調製する. 160 μ M Trolox 溶液を 50%エタノール水溶液で希釈し, 120, 80, 40 μ M Trolox 溶液を調製する.

プロトコール

- 1) 測定試料が 80%エタノール水溶液に溶解している場合, 20%エタノール水溶液を等量添加する.
- 2) 必要な場合, 測定試料を 50%エタノール水溶液で希釈する.

- 3) 96 穴プレートに Trolox と測定試料を分注する。
- 4) 200 mM MES 緩衝液を Well blank (A12) 以外に 50 μ L 添加する。
- 5) 列 H (測定試料自身の吸光度補正用) にエタノールを 50 μ L 添加する。
- 6) Well blank (A12) に 50%エタノール水溶液を 200 μ L 添加する。
- 7) Well blank (A12) と色補正列 (列 H) 以外に 800 μ M DPPH 溶液を 50 μ L 添加し、反応を開始させる。

※ 3) ~ 7) についてのレイアウトと手順は、それぞれ図 2 と図 3 を参照

- 8) 室温で 20 分間の反応後、プレートリーダーで 520nm の吸光度を測定する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Trolox 5 16 nmol	Trolox 4 12 nmol	Trolox 3 8 nmol	Trolox 2 4 nmol	Trolox 5 16 nmol	Trolox 4 12 nmol	Trolox 3 8 nmol	Trolox 2 4 nmol	Trolox 1 0 nmol	Trolox 1 0 nmol	Trolox 1 0 nmol	Well Blank
B	Sample 1 25 μ L	Sample 2 25 μ L	Sample 3 25 μ L	Sample 4 25 μ L	Sample 5 25 μ L	Sample 6 25 μ L	Sample 7 25 μ L	Sample 8 25 μ L	Sample 9 25 μ L	Sample 10 25 μ L	Sample 11 25 μ L	Sample 12 25 μ L
C	Sample 1 25 μ L	Sample 2 25 μ L	Sample 3 25 μ L	Sample 4 25 μ L	Sample 5 25 μ L	Sample 6 25 μ L	Sample 7 25 μ L	Sample 8 25 μ L	Sample 9 25 μ L	Sample 10 25 μ L	Sample 11 25 μ L	Sample 12 25 μ L
D	Sample 1 50 μ L	Sample 2 50 μ L	Sample 3 50 μ L	Sample 4 50 μ L	Sample 5 50 μ L	Sample 6 50 μ L	Sample 7 50 μ L	Sample 8 50 μ L	Sample 9 50 μ L	Sample 10 50 μ L	Sample 11 50 μ L	Sample 12 50 μ L
E	Sample 1 50 μ L	Sample 2 50 μ L	Sample 3 50 μ L	Sample 4 50 μ L	Sample 5 50 μ L	Sample 6 50 μ L	Sample 7 50 μ L	Sample 8 50 μ L	Sample 9 50 μ L	Sample 10 50 μ L	Sample 11 50 μ L	Sample 12 50 μ L
F	Sample 1 100 μ L	Sample 2 100 μ L	Sample 3 100 μ L	Sample 4 100 μ L	Sample 5 100 μ L	Sample 6 100 μ L	Sample 7 100 μ L	Sample 8 100 μ L	Sample 9 100 μ L	Sample 10 100 μ L	Sample 11 100 μ L	Sample 12 100 μ L
G	Sample 1 100 μ L	Sample 2 100 μ L	Sample 3 100 μ L	Sample 4 100 μ L	Sample 5 100 μ L	Sample 6 100 μ L	Sample 7 100 μ L	Sample 8 100 μ L	Sample 9 100 μ L	Sample 10 100 μ L	Sample 11 100 μ L	Sample 12 100 μ L
H	Sample 1 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 2 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 3 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 4 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 5 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 6 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 7 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 8 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 9 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 10 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 11 S ₁₀₀ -B (100 μ L)	Sample 12 S ₁₀₀ -B (100 μ L)

図 2 96 穴プレートでの DPPH ラジカル消去活性測定のレイアウト

2. 試験管を用いた評価法

準備するもの

1) 実験器具

- ・分光光度計 (520nm で吸光度の測定が可能なこと)
- ・試験管
- ・分注器
- ・連続分注器
- ・分光光度計用セル (溶液量 2.0mL で吸光度が測定可能なセル)
- ・ストップウォッチ
- ・ボルテックスマキサー
- ・pH メーター

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

A9~A11に50%エタノール水溶液を100μ L入れる

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

D1~D12とE1~E12に50%エタノール水溶液を50μ L入れる

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

測定試料1~12を各25μ L、B1~B12とC1~C12に分注する

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

希釈液を作製したTrolox溶液を 100μ Lずつ
A1~A4とA5~A8に入れる

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

測定試料1~12を各50μ L、D1~D12とE1~E12に分注する

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

A12以外に 200mM MES緩衝液を50μ L添加

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

測定試料1~12を各100μ L、F1~F12とG1~G12に分注する

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

H1~H12にエタノールを50μ L添加

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

測定試料1~12を各100μ L、H1~H12に分注する

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

A12に50%エタノール水溶液を200μ L添加

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

B1~B12とC1~C12に50%エタノール水溶液を75μ L入れる

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

A12とH1~H12以外にDPPH溶液を50μ L添加

図 3 96 穴プレートでの DPPH ラジカル消去活性測定における分注手順

2) 試薬

(1) 200 mM MES (2-morpholinoethanesulphonic acid) 緩衝液 (pH6.0)

(2) 400 μ M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 溶液

遮光したビーカーに DPPH を 15.76mg 秤量し、エタノール (100 mL) を添加後、回転子を入れ、スターラーで攪拌して溶解する。溶解は 30 分~1 時間かけて行う。DPPH 溶液は用時調製する。

(3) 50%エタノール水溶液

(4) 20%エタノール水溶液

(5) 100 μ M Trolox 溶液

① 2.0 mM Trolox stock solution の調製

Trolox を 12.51mg 秤量し、50%エタノール水溶液で溶解後、25mL に定容する。

Trolox stock solution は 200 μ L ずつ分注し、-40°C に保管する。

② 検量線用 Trolox 溶液の調製

2.0 mM Trolox stock solution (200 μ L) に 50%エタノール水溶液 (3.8 mL) を添加し、100 μ M Trolox 溶液を使用直前に調製する。

※調製方法の詳細は「96 穴プレートを用いた評価法」を参照

プロトコール

1. 測定試料が 80%エタノール水溶液に溶解している場合、20%エタノール水溶液を等量添加後、50%エタノール水溶液を用いて、Trolox 溶液の検量線範囲に入るように希釈する。
2. 試験管に 100 μ M Trolox 溶液を x μ L 分注する。($x = 0, 200, 400, 600, 800$)
3. Trolox 溶液を入れた試験管に 50%エタノール水溶液 (1000 - x) μ L 分注する。($x = 200, 400, 600, 800, 1000$)
4. 試験管に測定試料を x μ L 分注する。($x = 200, 400, 800$)
5. 測定溶液を入れた試験管に 50%エタノール水溶液 (1000 - x) μ L 分注する($x = 200, 600, 800$)
6. 200 mM MES 緩衝液を 500 μ L 添加する。
7. 400 μ M DPPH 溶液を 500 μ L 添加し、反応を開始させる。
8. 室温で 20 分間の反応後、分光光度計で 520nm の吸光度を測定する。
9. 測定試料自身の吸光度を測定するために、試験管に測定試料 800 μ L, 50%エタノール水溶液 200 μ L, 200 mM MES 緩衝液 500 μ L, エタノール 500 μ L 添加し、分光光度計で 520nm の吸光度を測定する。

プロトコールのポイント

1. DPPH 溶液の紫色は時間とともに次第に吸光度が減少してくるので、2 時間以内に使用することが望ましい。
2. 96 穴プレートを用いた評価では、測定試料 100 μL を用いて測定した場合に 160 μM Trolox 溶液で得られる吸光度値と同程度の吸光度が得られるように希釈することが望ましい。
3. 96 穴プレートを別途用意し、Trolox の希釈列の調製や分析試料の分注を行うと、測定用の 96 穴プレートへの分注が容易になる。
4. ピペティングリザーバーへ移した調製試薬は元の保存容器に戻さない。
5. 有機溶媒濃度が高い溶液 (DPPH 溶液等) の分注を行う時は、数回ピペティングを行うと液漏れが少なくなる。
6. 試験管を用いた評価法では DPPH 溶液添加後の反応時間に差が生じないように気を付ける。検体数が多い場合は、DPPH 溶液の添加と吸光度の測定を二人で分担したり、分光光度計にフローセルを取り付けたりすると短時間で多検体の測定が可能となる。
7. 測定試料が 80%エタノール水溶液に溶解していない場合は、Assay での溶媒組成、特に有機溶媒濃度を同一にすれば基本的には分析可能である。下記に分析可能な溶媒の例を示す。
 - 1) 70%アセトン/0.5%酢酸水溶液に測定試料が溶解している場合
30%アセトン水溶液を測定試料に等量添加して、測定を行う。Trolox 溶液は 50%アセトン水溶液で調製する。
 - 2) メタノールに測定試料が溶解している場合
脱イオン水を測定試料に等量添加して、測定を行う。Trolox 溶液は 50%メタノール水溶液で調製する。
 - 3) 上記以外にも脱イオン水やジメチルスルホキシド (DMSO)、トリフルオロ酢酸 (Assay 終濃度: 0.1%) の使用も可能である。なお、80%エタノール水溶液以外の溶媒に溶解した試料を測定する場合は、標準物質 (Trolox) を用いてあらかじめ測定を行い、80%エタノール水溶液の場合と同様な測定結果が得られるか (溶媒組成の影響がないことを) 確認する必要がある。

計算方法

DPPH ラジカル消去活性は Trolox で作成した回帰直線の傾きを用いて、分析試料の添加量 (原液換算 1L 当たり) に相当する Trolox 量として求める (mol Trolox equivalent/L)。測定試料の濃度が既知 (例: g-fresh weight/L, mol/L) の場合は、その数値で除することにより単位新鮮物重量 (モル) 当たりの DPPH ラジカル消去

活性を算出する (mol Trolox equivalent/ g-fresh weight, mol Trolox equivalent/ mol) .

1. Trolox の一次回帰式は、横軸に Trolox 添加量 (nmol/assay), 縦軸に 520nm における吸光度値 (A_{520}) をプロットし、直線性の維持されている範囲内で求める。

$$Y = a_1 \times X + b_1 \quad (Y : A_{520}, X : \text{Trolox 添加量})$$

2. 測定試料自身が 520nm で吸光度を示す場合 (例: アントシアニン), DPPH 溶液の代わりにエタノールを加え、同一溶媒組成において吸光度値 (S_{100-B}) を測定し (列 H), 測定試料自身の吸光度値を差し引き吸光度値の補正を行う。なお、補正吸光度値は下記の式に従い算出する。

(例) 50 μL の測定試料を添加した場合

$$(\text{補正吸光度値}) = (\text{試料測定時の吸光度}) - (S_{100-B}) \times 50 / 100$$

3. 測定試料では横軸に原液添加量 ($\mu\text{L}/\text{assay}$), 縦軸に 520nm における吸光度値もしくは補正吸光度値をプロットし、相関係数 0.995 以上の直線性が維持されている範囲で一次回帰式を求める。

$$Y_s = a_2 \times X_s + b_2 \quad (Y_s : A_{520}, X_s : \text{原液添加量})$$

※原液添加量: 96 穴プレートに分注する測定試料量は 25, 50, 100 μL であるが、分注前にあらかじめ 4 倍に希釈した場合、横軸(原液添加量)はそれぞれ 6.25, 12.5, 25 ($\mu\text{L}/\text{assay}$) となる。

4. 3. で得られた測定試料での一次回帰直線の傾き (a_2) を Trolox での回帰直線の傾き (a_1) で除し、DPPH ラジカル消去活性を算出する。

$$\begin{aligned} \text{DPPH ラジカル消去活性 (nmol-Trolox 相当量}/\mu\text{L}) &= a_2 / a_1 \\ &= \text{分析試料の傾き (A}_{520} / (\mu\text{L}/\text{assay})) / \text{Trolox の傾き (A}_{520} / (\text{nmol}/\text{assay})) \end{aligned}$$

図 4 における試料 A の DPPH ラジカル消去活性を算出した例を下記に示す。

$$\begin{aligned} \text{DPPH ラジカル消去活性} &= 0.0321 / 0.0596 = 0.538 \text{ (nmol-Trolox 相当量}/\mu\text{L}) \\ &= 538 \text{ (}\mu\text{mol-Trolox 相当量}/\text{L}) \end{aligned}$$

後片付け

測定試料の調製で用いたチップなどのプラスチック器具や測定終了後の溶液などの廃液は所属機関の規定に準じ、適切に処理する。

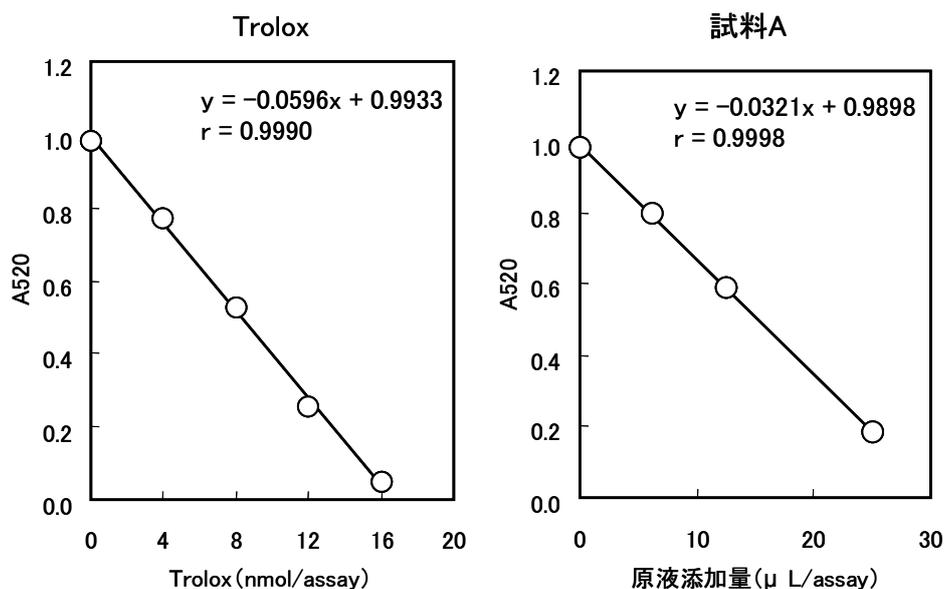


図 4 Trolox と試料 A の DPPH ラジカル消去活性測定結果

おわりに

DPPH ラジカルを用いた抗酸化活性評価法は簡便であり、96 穴プレートでは 12 検体を同時に測定できる。一方で変法が多く存在し、研究者間でのデータの交互比較ができない現状もある。特に DPPH ラジカル消去能をラジカルを 50% 消去するのに必要な量で求める場合、測定に用いる DPPH 溶液の濃度が異なると同一測定試料でも得られる結果が異なってくる。本プロトコールでは Trolox を標準物質として常に同一条件下で測定し、その相当量で DPPH ラジカル消去活性を算出していることから、測定者間での結果のばらつきが小さく、研究者間での結果の交互比較を可能としていることを特長とする。なお、本法は沖縄県産果実類・野菜類のスクリーニングに用いており、亜熱帯に特有な果実類が高いラジカル消去活性を示すことや DPPH ラジカル消去活性とポリフェノール含量との相関が高いことなどが報告されている。

参考文献

- 1) 須田郁夫, 沖智之, 西場洋一, 増田真美, 小林美緒, 永井沙樹, 比屋根理恵, 宮重俊一, 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性, 食科工, **52**, 462-471 (2005).
- 2) 須田郁夫, 3-3-9 抗酸化機能 ①分光学的抗酸化活性評価, 「食品機能研究法」篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編, (光琳, 東京), pp.218-223 (2000).

(2) ORAC 法

(独) 農研機構 九州沖縄農業研究センター 沖 智之
国立健康・栄養研究所 竹林 純
太陽化学株式会社 山崎 光司

はじめに

近年、紫外線の増加や大気汚染、喫煙、精神的なストレスなどにより、体内で活性酸素種が発生することが知られている。過剰に発生した活性酸素種は体内で細胞や DNA を損傷し、癌や成人病、老化の原因となることが考えられている。このため、体内では活性酸素種を消去する機構が存在し、SOD やカタラーゼなどの生体内酵素での防御機構や、ビタミン C や β -カロテンなどの食品などから得られた抗酸化物質による防御機構がある。そして、成人病予防や老化抑制の観点から抗酸化物質の重要性が示され、抗酸化物質に対して様々な抗酸化能評価法が確立されている。Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) は米国国立老化研究所の Cao らによって確立された抗酸化能評価法であり、米国農務省 (USDA) にて食品の抗酸化能評価に使用されている。ORAC は、ラジカル発生剤である AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride) より発生したペルオキシラジカルによって、標識物質である Fluorescein が分解される過程を、Fluorescein の蛍光強度を経時的に測定することで追跡する。

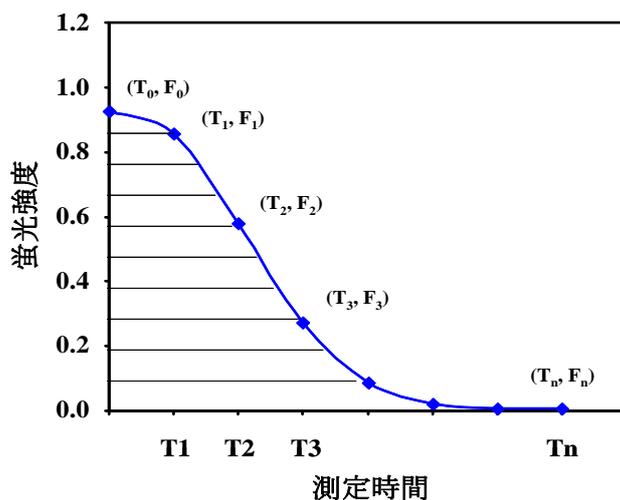


図 1 AUC の算出方法

$$AUC = (0.5 + F_1/F_0 + F_2/F_0 + F_3/F_0 + \dots + F_n/F_0) \times CT$$

F : Fluorescein の蛍光強度, CT : 測定間隔時間

この追跡によって **Fluorescein** の蛍光強度のグラフが得られ、蛍光強度の軸と時間軸とのグラフの軌跡によって囲まれた面積 (Area Under Curve : AUC) を算出する (図 1)。

この AUC は使用する抗酸化物質によって異なり、この AUC の違いを標準物質である Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) での AUC に対して相対的に評価する。具体的には、標準物質である Trolox での AUC から抗酸化物質非存在下での blank の AUC を差し引いた net AUC に対し、抗酸化物質での net AUC の相対値を得て、これに抗酸化物質の溶液での希釈倍率と濃度を考慮し、Trolox 当量 (Trolox Equivalent : TE) として示す。このため ORAC は抗酸化物質による活性酸素種への阻害効果を時間とその度合いの両方で評価することができる。なお、本項は Prior らの方法を参考に作成したものである。

準備するもの

1. 実験器具

- ・ 96 穴プレート対応蛍光プレートリーダー

(必須要件)

- ・ Ex. 485 nm, Em. 520 nm 付近のフィルターが装着されていること
- ・ 37°C で温度制御が可能なこと

(推奨要件)

- ・ 自動分注機が装備されていること
- ・ bottom での蛍光検出が可能なこと

※bottom からの蛍光検出により測定値の精度が向上する (参考文献 2))

- ・ 恒温槽 (37°C に設定)
- ・ pH メーター
- ・ 天秤 (最小表示値が 1 mg 以下のもの)
- ・ 96well 平底クリアプレート (推奨 : FALCON 社製 35-3072)
- ・ マイクロピペット
- ・ 8 (12) チャンネルマイクロピペットもしくは自動分注機
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ
- ・ 100 mL 容メスフラスコ
- ・ 200 mL 容メスフラスコ
- ・ 25 mL 容ホールピペット

2. 試薬

- 1) Assay buffer (75 mM potassium phosphate buffer (pH7.4))

A : 75 mM K₂HPO₄ (FW 174.18) 6.53 g を 500 mL の超純水に溶解する。

B : 75 mM KH_2PO_4 (FW 136.09) 5.10 g を 500 mL の超純水に溶解する。

A に B を加えて、pH を 7.4 に調整する。Assay buffer は冷蔵保存する。

2) Fluorescein (FL) 溶液

(1) FL stock solution #1 の調製 (1.2 mM)

FL sodium salt (Sigma 社製, F6377-100G, $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Na}_2\text{O}_5$, FW 376.28) 90 mg を 200 mL の Assay buffer に溶解する。

(2) FL stock solution #2 の調製 (6.0 μM)

FL stock solution #1 (50 μL) と Assay buffer (10 mL) を加える。

※stock solution は#1 と#2 共に暗所冷蔵保存 (数ヶ月は保管可能)

(3) FL working solution の調製 (94.4 nM)

FL stock solution #2 (400 μL) と Assay buffer (25 mL) を加える。

3) Trolox ((\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 溶液

(1) Trolox stock solution の調製

Trolox (Aldrich 社製, 238813-1G, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, FW 250.29) 100 mg を Assay buffer (200 mL) に溶解する (2 mM Trolox)。これをホールピペット (25 mL) で取り 100 mL 容メスフラスコへ移して定容する (500 μM Trolox)。Trolox stock solution は 100 μL ずつ分注し、 -40°C に保管する。

(2) Trolox 標準溶液の調製

500 μM Trolox stock solution (100 μL) に Assay buffer (900 μL) を添加し、50 μM Trolox 溶液を調製する。50 μM Trolox 溶液を Assay buffer で希釈し、25, 12.5, 6.25 μM Trolox を調製する。

4) AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane)Dihydrochloride) 溶液

薬包紙に秤量した AAPH (Wako 社製 1 級, 017-11062, FW271.17) 129 mg を Assay buffer (15 mL) に溶解する (8.6 mg/mL, 31.7 mM)。

※AAPH を溶解させる Assay buffer はあらかじめ 37°C の恒温槽中で加温する。

※秤量した AAPH は、ORAC 測定を開始する直前に溶解して使用する。

5) AWA 溶液

アセトン (700 mL) と超純水 (295 mL), 酢酸 (5 mL) を混合し、アセトン : 水 : 酢酸 = 70 : 29.5 : 0.5 (v : v : v) を調製する。

3. サンプル溶液の調製

1) サンプルが純品や AWA 溶液に溶解する場合

(1) サンプル原液の調製

正確に秤量したサンプル (100 mg) をビーカーへ移し、AWA 溶液 (80 mL) に溶解する。そして、溶液を 100 mL 容メスフラスコに移して定容する。

※サンプルが完全に溶解しきれない場合は、溶液量を増やす。

(2) サンプル希釈溶液の調製

サンプル原液を Assay buffer で希釈し、アセトン濃度が 0.7% 以下となるようにサンプル希釈溶液を調製する。また、50 μ M Trolox の net AUC と 6.25 μ M Trolox の net AUC の間にサンプル希釈溶液の net AUC が収まるように希釈倍率を設定する。

2) 試料が凍結乾燥品の場合 (参考文献 2) を基に作製)

- (1) 遠沈管に凍結乾燥物を 1 g 精秤する。
- (2) ヘキサン : ジクロロメタン = 1 : 1 (v : v) を 10 mL 添加する。
- (3) 室温で 30 秒間攪拌する。
- (4) 遠心分離 (3000 rpm, 室温, 10 分間) を行い, 上清を取り除く。
- (5) 沈殿物にヘキサン : ジクロロメタン = 1 : 1 (v : v) を 10 mL 添加し, (3) から (4) の操作を繰り返す。
- (6) 沈殿物に含まれる溶媒を窒素気流下もしくは減圧下で除去する。
- (7) 溶媒を除去した沈殿物に AWA 溶液を 10 mL 添加する。
- (8) 室温で 30 秒間攪拌する。
- (9) 超音波洗浄機を用いて 37°C で 5 分間の超音波処理を行う。
- (10) 室温で 10 分間静置する。
- (11) 室温で 30 秒間攪拌する。
- (12) 遠心分離 (3000 rpm, 室温, 10 分間) を行い, 上清を 25 mL 容メスフラスコに移す。
- (13) 沈殿物には AWA 溶液を 10 mL 添加し, (8) から (12) の操作を繰り返す。
- (14) 測定試料の抽出液が入ったメスフラスコを AWA 溶液で 25 mL に定容し, サンプル原液とする。

3) 試料が液体の場合 (参考文献 3) を基に作製)

- (1) 遠沈管に液体試料を 1 g 精秤する。
- (2) AWA 溶液を 10 mL 添加する。
- (3) 室温で 30 秒間攪拌する。
- (4) 超音波洗浄機を用いて 37°C で 5 分間の超音波処理を行う。
- (5) 室温で 10 分間静置する。
- (6) 室温で 30 秒間攪拌する。
- (7) 遠心分離 (3000 rpm, 室温, 10 分間) を行い, 上清を 25 mL 容メスフラスコに移す。
- (8) 沈殿物には AWA 溶液を 10 mL 添加し, (3) から (7) の操作を繰り返す。
- (9) 測定試料の抽出液が入ったメスフラスコを AWA 溶液で 25 mL に定容し, サンプル原液とする。

4) 試料が凍結乾燥品で高速溶媒抽出装置を用いる場合

(参考文献 4) を基に作製)

- (1)凍結乾燥品を 0.5 g～1.0 g 精秤する.
- (2)海砂 (5 g) と試料を混合させた後, 高速溶媒抽出用のセル (11 mL) に移し, 高速溶媒抽出装置 (Dionex 社製, ASE200) にセルを設置する.
- (3)ヘキサン : ジクロロメタン = 1 : 1 (v : v) を用いて下記の条件で抽出を行う.
static time : 5 分間, flush : 60%, purge : 60 秒間
cycle : 3, temperature : 70°C, pressure : 1500 psi
- (4)AWA 溶液を用いて下記の条件で抽出を行う.
static time : 5 分間, flush : 60%, purge : 60 秒間
cycle : 3, temperature : 80°C, pressure : 1500 psi
- (5)捕集バイアルに抽出された溶液を 25 mL 容メスフラスコに移した後に AWA 溶液で 25 mL に定容し, サンプル原液とする.

プロトコール

1. 蛍光プレートリーダーの起動
96well マイクロプレート対応蛍光プレートリーダーを起動し, あらかじめ 37°C に加温しておく.
2. サンプル溶液の分注
プレートレイアウト (図 2) に従い, Trolox 溶液 (20 µL) とサンプル溶液 (20 µL) をマイクロプレートに分注する. Blank には Assay buffer (20 µL) を分注する. なお, 外周の well には 300 µL 程度の脱イオン水を満たす.
3. FL 溶液の分注と蛍光強度 (f_{0min}) の測定 (f_{0min} : 測定開始 0min の蛍光強度)
2.のマイクロプレートに FL 溶液 (200 µL) を分注し, 振とう攪拌後, 蛍光強度を測定する.
4. マイクロプレートの加温
3.のマイクロプレートを 37 °C で 10 分以上加温する.
5. AAPH 溶液の調製
AAPH を使用直前に Assay buffer に溶解する.
6. 蛍光強度の測定 ($f_{2min} \sim f_{90min}$)
8 (12) チャンネルマイクロピペットを用い, 4. のマイクロプレートに AAPH 溶液 (75 µL) を加えて振とう攪拌後, 添加 2 分後から測定を開始する (AAPH 注入直前を反応開始 0min とし, 反応開始 2 分後の蛍光強度を f_{2min} とする).
なお, 測定条件は以下の通り.

測定間隔：2 分間，測定回数：45 回（90 分間）

蛍光検出波長：Ex. 485nm 付近，Em. 520nm 付近

蛍光検出方向：bottom もしくは top

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Blank	Trolox 50 μ M	Trolox 25 μ M	Trolox 12.5 μ M	Trolox 6.25 μ M	Trolox 6.25 μ M	Trolox 12.5 μ M	Trolox 25 μ M	Trolox 50 μ M	Blank	
C		Sample 1 10倍希釈	Sample 2 10倍希釈	Sample 3 10倍希釈	Sample 4 10倍希釈	Sample 5 10倍希釈	Sample 5 80倍希釈	Sample 4 80倍希釈	Sample 3 80倍希釈	Sample 2 80倍希釈	Sample 1 80倍希釈	
D		Sample 1 20倍希釈	Sample 2 20倍希釈	Sample 3 20倍希釈	Sample 4 20倍希釈	Sample 5 20倍希釈	Sample 5 40倍希釈	Sample 4 40倍希釈	Sample 3 40倍希釈	Sample 2 40倍希釈	Sample 1 40倍希釈	
E		Sample 1 40倍希釈	Sample 2 40倍希釈	Sample 3 40倍希釈	Sample 4 40倍希釈	Sample 5 40倍希釈	Sample 5 20倍希釈	Sample 4 20倍希釈	Sample 3 20倍希釈	Sample 2 20倍希釈	Sample 1 20倍希釈	
F		Sample 1 80倍希釈	Sample 2 80倍希釈	Sample 3 80倍希釈	Sample 4 80倍希釈	Sample 5 80倍希釈	Sample 5 10倍希釈	Sample 4 10倍希釈	Sample 3 10倍希釈	Sample 2 10倍希釈	Sample 1 10倍希釈	
G		Blank	Trolox 50 μ M	Trolox 25 μ M	Trolox 12.5 μ M	Trolox 6.25 μ M	Trolox 6.25 μ M	Trolox 12.5 μ M	Trolox 25 μ M	Trolox 50 μ M	Blank	
H												

図 2 プレートレイアウト

注) 希釈倍率は例

プロトコルのポイント

1. 分析に使用する抗酸化物質には光や熱に弱いものもあるので，遮光し低温で取り扱う。
2. AAPH はアゾ化合物のため取扱いには注意する。
3. 測定は温度によって大きな影響を受けるため，温度管理を徹底する。
4. マイクロピペットを使用して AAPH を注入する場合は，本測定を行う前に，あらかじめ練習をしておく。
5. プレート内では well 間で値が大きく変動するため，サンプルのレイアウトは必ず点対称となるようにする。また異なるプレートレイアウトで同一サンプルを繰り返し測定することで ORAC 値の信頼性が高まる。

計算方法

1. 得られた各ウェルでの蛍光強度測定結果より，各サンプルの AUC を算出する。
AUC の計算方法は以下の通り。

$$AUC = (0.5 \times f_{8\text{min}} + f_{10\text{min}} + f_{12\text{min}} + f_{14\text{min}} + \dots + f_{88\text{min}} + 0.5 \times f_{90\text{min}}) / f_{0\text{min}} \times 2$$

$f_{8\text{min}}$: 測定開始 8 分後の蛍光強度

2. 得られた AUC より net AUC を算出する. net AUC の計算方法は以下の通り.

$$\text{net AUC}_{\text{Trolox}} = \text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$$

$$\text{net AUC}_{\text{sample}} = \text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$$

3. 各 Trolox 溶液の net AUC を X 軸に, 各 Trolox 溶液の濃度 (μM) を Y 軸にプロットしたグラフ (例を図 3 に示す) より, 二次回帰式 ($y = ax^2 + bx + c$) を算出する. この回帰式より, 以下の計算方法から ORAC 値を算出する.

$$\text{ORAC } (\mu\text{mol TE/g}) = \frac{[a \times (\text{netAUC}_{\text{sample}})^2 + b \times (\text{netAUC}_{\text{sample}}) + c] \times V \times d}{W}$$

a, b, c : 二次回帰式の a, b, c

V : サンプル原液の溶液量 (mL)

d : サンプル原液の希釈倍率

W : サンプル重量 (mg)

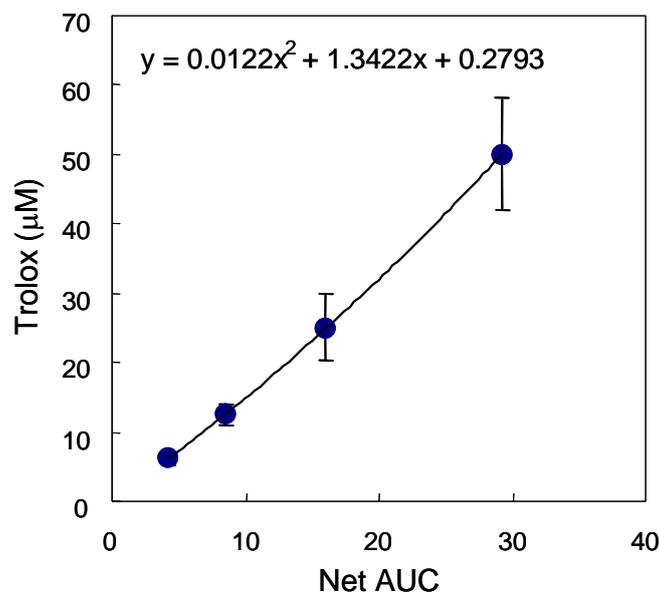


図 3 Trolox の検量線

net AUC は各 Trolox 濃度 4 点での測定の平均値±標準偏差で表示

後片付け

1. 使用した AAPH と FL, AWA 溶液は有機廃液として処理する.
2. メスフラスコ, ホールピペットは漬け洗いをを行う.
3. その他の器具について適した方法で後片付けを行う.

おわりに

米国では ORAC 値を表記した食品が主にドリンク, サプリメントの形態などで既に 100 製品以上販売されており, さらに ORAC 法は AOAC (Association of Official Analytical Chemists) で妥当性の検証が行われている. 一方, 日本では食品の抗酸化力に対する統一した指標「Antioxidant Unit」を確立し, 食品における抗酸化物質の普及を通じて, 国民の健康に寄与することを目的とした Antioxidant Unit 研究会 (AOU 研究会) が 2007 年 4 月に設立されている. 本研究会においても現時点では ORAC 法を支持しており, ポリフェノール系抗酸化物質の評価法に用いる方向で検討が行われている. 今後, AOU 研究会では ORAC 法の標準化を行う予定であり, 最新のプロトコールの配布も予定している. これらの情報についてはホームページ (<http://www.antioxidant-unit.com/index.htm>) を参照されたい.

参考文献

- 1) Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, A.J. and Prior, L.R., High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4437-4444 (2002).
- 2) Prior, L.R., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. and Jacob, R., Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3273-3279 (2003).
- 3) Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4026-37 (2004).
- 4) Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, B.D., Gebhardt, E.S., Beecher, G. and Prior, L.R., Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *J. Food Comp. Anal.*, **17**, 407-422 (2004).

I. 実験の基礎技術

1. 機能性成分の分析技術

1) 総ポリフェノールの定量法

(独) 農研機構 九州沖縄農業研究センター 沖 智之

はじめに

ポリフェノールは芳香環に結合した二つ以上の水酸基(フェノール性水酸基)を有した化合物の総称であり、その化学構造からフェノールカルボン酸類、フェノールアミン類、フラボノイド化合物のアントシアニン類、フラボン類およびタンニン類などに大別される。食品中でのポリフェノールは味(収斂味、苦味)や色(褐変反応)、香りという嗜好性に関連する成分として良く知られていたが、近年では生体内での抗酸化作用をはじめとした数多くの健康機能性に関与していることが報告されるようになり、機能性成分としても注目を浴びている成分である。食品やその原材料である植物体に含まれるポリフェノールを定量する方法として、高速液体クロマトグラフィーなどによる分離技術との組み合わせにより、種類別や個別に定量する方法が挙げられるが、操作が煩雑であり、また多様な化学構造を有するポリフェノール成分の標品が入手できないなどの理由により、汎用性で劣る。このような理由から、食品や植物体のポリフェノールは総量として測定する方法が採用されることが多く、その中でもフォーリン-チオカルト試薬を用いた方法が頻用されている。フォーリン-チオカルト試薬は調製することも可能であるが、本項では市販されている調製試薬を用いた簡便な総ポリフェノールの定量法を紹介する。

準備するもの

1. 実験器具

- ・分光光度計(750nm の吸光度が測定できるもの)
- ・分光光度計用セル
- ・天秤(最小表示値が 0.1 mg 以下のもの)
- ・ボルテックスミキサー
- ・脱イオン水製造装置(JIS K0557:1998 で規定されるクラス A2 以上の水を製造可能なこと)
- ・マグネットスターラー
- ・マイクロピペット
- ・遠心分離機(反応溶液に白濁が生じた場合、清澄な溶液を得るために使用)
- ・ビーカー(100mL, 300mL, 500mL, 1L)

- ・メスシリンダー(100mL, 500mL)
- ・メスフラスコ(100mL, 1L)
- ・メジューム瓶(100mL, 500mL, 1L)
- ・硬質ガラス製試験管(液量 3mL で十分に攪拌ができ、遠心分離機で使用できるもの)
- ・PTFE 製攪拌子
- ・薬さじ
- ・薬包紙

2. 試薬

1) フェノール試薬希釈液

- (1) フェノール試薬(和光純薬製, コード No.279-08895)100mL を 100mL メスシリンダーで量り取り, 300mL ビーカーに移す.
- (2) 脱イオン水 100mL を 100mL メスシリンダーで量り取り, (1)でフェノール試薬を入れた 300mL ビーカーに移し, マグネットスターラーを用いて攪拌混和する.

※フェノール試薬希釈液は用時調製する.

2) 10% (w/v) 炭酸ナトリウム溶液

- (1) 炭酸ナトリウム(JIS K8625:2006, 特級)100g を 1L ビーカーに量り取り, 800mL 程度の脱イオン水を入れ, マグネットスターラーを用いて攪拌, 溶解する.
- (2) 1L メスフラスコに(1)の溶液を移し, 脱イオン水で 1L に定容する.
- (3) (2)の溶液を 1L メジューム瓶に移し, 蓋をして, 室温で保存する(室温で 2 ヶ月は保存可能).

3) 80% (v/v) エタノール溶液

- (1) エタノール(JIS K8101:2006, 特級)400mL を 500mL メスシリンダーで量り取り, 500mL ビーカーに移す.
- (2) 脱イオン水 100mL を 100mL メスシリンダーで量り取り, (1)の 500mL ビーカーに移し, マグネットスターラーを用いて攪拌混和する.
- (3) (2)の溶液を 500mL メジューム瓶に移し, 蓋をして, 室温で保存する(室温で 2 ヶ月は保存可能).

4) 没食子酸溶液

- (1) 没食子酸(一水和物:分子量 188.14)18.8mg を薬包紙へ量り取る.
※没食子酸の量り込み量は 0.1mg 単位で記録し, 正確な濃度を算出する.
- (2) (1)の没食子酸を 100mL ビーカーに移し, 80mL 程度の 80% (v/v) エタノール

溶液を入れ、マグネットスターラーを用いて攪拌、溶解する。

- (3) 100mL メスフラスコに(2)の溶液を移し、80% (v/v) エタノール溶液で 100mL に定容する。
- (4) (3)の溶液を 100mL メジューム瓶に移し、蓋をして、室温で保存する(4°Cで 2ヶ月は保存可能)。

プロトコール

1. 分光光度計を起動させ、測定波長を 750nm に設定する。
2. 没食子酸溶液を試験管に以下の表に従ってマイクロピペットで分注した後に、80% (v/v) エタノール溶液と脱イオン水を分注する。

	STD 0	STD 1	STD 2	STD 3
没食子酸溶液	0 μ L	60 μ L	180 μ L	300 μ L
80% (v/v) エタノール溶液	500 μ L	440 μ L	320 μ L	200 μ L
脱イオン水	500 μ L			

3. 試料が 80% (v/v) エタノール溶液に溶解している場合、試料溶液 500 μ L を試験管にマイクロピペットで分注した後に、脱イオン水 500 μ L を分注する。
4. 2. と 3. でそれぞれ没食子酸溶液と試料溶液を分注した試験管にマイクロピペットでフェノール試薬希釈液 1mL を分注し、迅速にボルテックミキサーで攪拌混和する。
5. 4. の試験管を室温で 3 分間放置後、10% (w/v) 炭酸ナトリウム溶液 1mL を試験管にマイクロピペットで分注し、迅速にボルテックミキサーで攪拌混和する(図 1)。
6. 5. の試験管を 60 分間放置する。
※試験管内の反応溶液が白濁した場合は吸光度が測定できないので、室温下で遠心分離を行い清澄な溶液を得る。
7. 没食子酸と試料の反応溶液を分光光度計用セルに移し、750nm における吸光度を測定する。なお、吸光度は緩やかに増大するため、30 分以内(炭酸ナトリウム溶液を添加 60 分後から 90 分後まで)に測定する。
※試料の反応溶液の吸光度が没食子酸で作成した検量線範囲外の場合は、試料溶液を 80% (v/v) エタノール溶液で希釈し、3. の手順から再度行う。

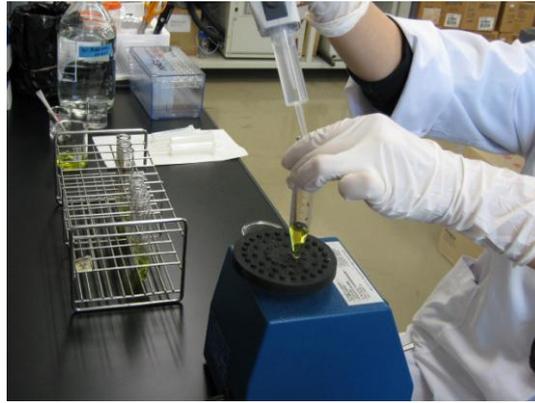


図 1 炭酸ナトリウム溶液を添加する操作

フェノール試薬希釈液の場合も同様に添加後は迅速に攪拌混和する

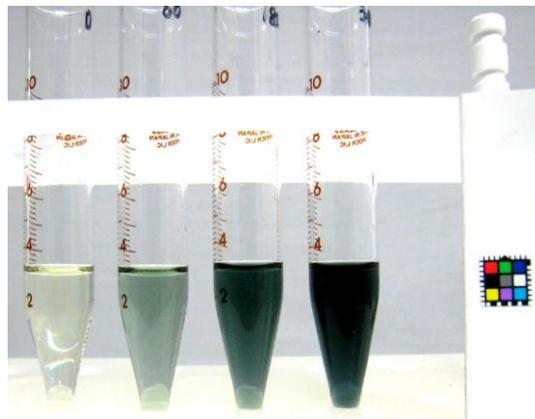


図 2 没食子酸を添加した場合の呈色

没食子酸量は左から 0, 60, 180, 300nmol/assay

炭酸ナトリウム水溶液を添加 60 分後に撮影

プロトコールのポイント

1. プロトコールの手順 2. ～ 5. における同一溶液・容量の分注操作を連続分注器 (エッペンドルフ社製マルチペットプラス 4981 など)で行うと、多検体の測定が容易になる。
2. フェノール試薬希釈液は用時調製する。
3. 図 1 のようにフェノール試薬希釈液と 10% (w/v) 炭酸ナトリウム溶液の分注はボルテックスミキサーの近くで行い、分注後は迅速にボルテックミキサーで攪拌混和する。
4. 試験管内の溶液が白濁した場合、冷却して遠心分離を行うと白濁物質が増加する。
5. 筆者の研究室では、白濁物質を完全に沈殿させるために、試験管に入った溶液

を 2mL マイクロチューブに移し、遠心分離(12000rpm, 25°C, 10 分間)を行っている。

6. 10% (w/v) 炭酸ナトリウム溶液は必要量を 100mL ビーカーに移して使用し、元の保存容器に戻さない。
7. 分光光度計への自動試料導入装置(日本分光製 QFS-480P 型クイックフローサンプラーなど)を取り付けると短時間で多検体の測定が可能となる。
8. 測定試料が 80% (v/v) エタノール溶液に溶解していない場合は、Assay での溶媒組成、特に有機溶媒濃度を同一にすれば基本的には分析可能である。下記に分析可能な溶媒の例を示す。

(1) 70%アセトン/0.5%酢酸溶液に測定試料が溶解している場合

	STD 0	STD 1	STD 2	STD 3
没食子酸溶液	0	60μL	180μL	300μL
80% (v/v) エタノール溶液	300μL	240μL	120μL	0μL
70%アセトン/0.5%酢酸溶液	200μL			
脱イオン水	500μL			

試料溶液	200μL
80% (v/v) エタノール溶液	300μL
脱イオン水	500μL

(2) メタノールに測定試料が溶解している場合

	STD 0	STD 1	STD 2	STD 3
没食子酸溶液	0	60μL	180μL	300μL
80% (v/v) エタノール溶液	300μL	240μL	120μL	0
メタノール	200μL			
脱イオン水	500μL			

試料溶液	200μL
80% (v/v) エタノール溶液	300μL
脱イオン水	500μL

(3) 試料が水溶液の場合

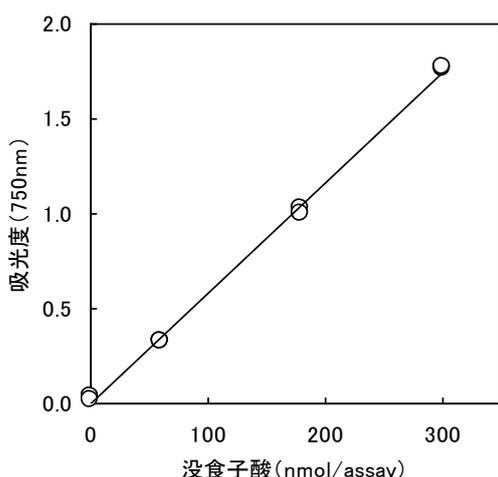
	STD 0	STD 1	STD 2	STD 3
没食子酸溶液	0μL	60μL	180μL	300μL
80% (v/v) エタノール溶液	500μL	440μL	320μL	200μL
脱イオン水	500μL			

試料溶液	500μL
80% (v/v) エタノール溶液	500μL

なお、上記以外の溶媒に溶解した試料を測定する場合は、没食子酸を用いてあらかじめ測定を行い、溶媒組成の影響がないことを確認する必要がある。

計算方法

1. 没食子酸量(nmol/assay)を X 軸に、吸光度(A_{750})を Y 軸にプロットして、検量線を作成する(図 3)。
2. 試料溶液の総ポリフェノール量は 1. で作成した検量線から試料溶液当たりの没食子酸相当量として求める(mol-gallic acid equivalent/L, mol-GAE/L)。
3. 凍結乾燥品から測定試料を調製した場合(g-fresh weight/L)や濃度が既知の場合(mol/L)は、その数値で除することにより単位新鮮物重量やモル当たりの総ポリフェノール量が算出できる(mol-GAE/g-fresh weight, mol-GAE/mol)。



測定日	傾き	切片	相関係数
2008/5/23	0.0058	-0.0029	0.9991
2008/7/30	0.0057	0.0461	0.9997
2008/7/30	0.0057	0.0563	0.9987
2008/9/9	0.0059	-0.0103	0.9980
2008/9/19	0.0057	-0.0007	0.9994
2008/10/17	0.0058	-0.0083	0.9985
2008/10/24	0.0059	-0.0087	0.9982
平均値	0.0058	0.0102	0.9988
標準偏差	0.0001	0.0284	0.0006

図 3 没食子酸で作成した検量線の例と異なる測定日に作成した検量線データ
 検量線は没食子酸の各添加量において 2 反復で作成

後片付け

1. フォーリンーチオカルト試薬には重金属であるモリブデンとタングステンが使用されているので、規程に準じて重金属を含む廃液として処理する。
2. 試験管に白色の物質が付着した場合は、水を張った洗い桶に酢酸を入れてから試験管を浸けると取り除くことができる。

おわりに

市販の調製試薬(フォーリンーチオカルト試薬)を用いた総ポリフェノールの定量法は簡便であり、植物体中で多様な化学構造を有するポリフェノールの総量を没食子

酸相当量として算出できるという点では優れた方法である。筆者らは沖縄県産果実類・野菜類のスクリーニングに本法を用いており、亜熱帯に特有な果実類の総ポリフェノール含量が高いことを明らかにしており、またポリフェノールを高含有した農作物が高い抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性)を示すことを報告している。

標準物質には没食子酸を用いることが多いが、これはフォーリンーチオカルト試薬を活用した研究初期でワインやスピリッツを測定対象としていたという歴史的な背景もあるが、没食子酸が安価に入手できることや溶解性、安定性、検量線の直線性範囲という実際の測定上の面でも優れていることが理由である。対象とするポリフェノール成分が限定されている場面では、(+)-カテキンやクロロゲン酸などを標準物質にすることも可能であるが、それらで検量線を作成して試料中の総ポリフェノール量を算出するのではなく、相当量として表記したいポリフェノール成分と没食子酸との換算係数をあらかじめ算出しておき、測定毎に没食子酸で作成した検量線から試料中の総ポリフェノールを定量後、換算係数を乗じて算出する方法が実用的である。

参考文献

- 1) Singleton, V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventós, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymol.*, **299**, 152-178 (1999).
- 2) 須田郁夫, 沖智之, 西場洋一, 増田真美, 小林美緒, 永井沙樹, 比屋根理恵, 宮重俊一, 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性, *食科工*, **52**, 462-471 (2005).