琉球大学学術リポジトリ

[報文]アルデヒド・カルボン酸系を用いた黒糖抽出物の抗酸化活性の測定

メタデータ	言語:
	出版者: 南方資源利用技術研究会
	公開日: 2014-10-26
	キーワード (Ja): 黒糖, 抗酸化, ガスクロマトグラフィー
	キーワード (En):
	作成者: 和田, 浩二, 高良, 健作, 玉村, 隆子, 仲宗根, 洋子, WADA, Koji, TAKARA, Kensaku, TAMAMURA, Takako, NAKASONE, Yoko
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016589

南方資源利用技術研究会誌　Vol.16 No.1　1～4　2000

アルデヒド・カルボン酸系を用いた黒糖抽出物の抗酸化活性の測定

和　田　浩　二・高　良　健　作・玉　村　隆　子・仲宗根　洋　子

*琉球大学農学部

Antioxidative activity of extract from Kokuto in a hexanal/hexanoic acid system.

Koji WADA, Kensaku TAKARA, Takako TAMAMURA and Yoko NAKASONE

Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, Senbaru 1, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan

Key words: 黒糖、抗酸化、ガスクロマトグラフィー

緒　言

酸化は食品において、品質低下、変敗などの劣化を引き起こし、生体内では細胞の機能性低下や動脈硬化等の原因となっている。さらには、癌の発生や老化にも関与していると考えられている。これらの予防として、食品の３次機能、すなわち生体調節機能の一つである食品由来の抗酸化性物質が注目されている[1)]。

*in vitro*系における抗酸化力の測定方法は試験管モデル系と生体モデル系に大別される[2)]。試験管モデル系の評価は非常にシンプルであることから、抗酸化性物質の検索に適している。特に、食品成分の抗酸化力の評価には脂質の過酸化によって生成する過酸化脂質を測定するロダン鉄法、過酸化脂質の分解により生成するマロンジアルデヒドを測定するTBA法といった分光学的な手法が多くの研究で用いられている。しかし、両手法とも比較的簡便に脂質の過酸化度を測定できる利点を持っているが、過酸化物に対する特異性、使用する基質の安定性などいくつかの問題点をかかえている。

本研究では、酸化によるアルデヒドからカルボン酸への変化をガスクロマトグラフ（GC）で測定する抗酸化活性測定法を検討するとともに、天然抗酸化剤としてα－トコフェロール（α-Toc）、人工抗酸化剤としてブチルヒドロキシアニソール（BHA）および食品由来のものとして黒糖の有機溶媒粗抽出物の抗酸化活性を本法およびロダン鉄法で比較した。

*沖縄県西原町千原１番地

実験方法

１．GCによる抗酸化活性測定法

抗酸化活性測定はヘキサナールのカプロン酸への変化をモニターすることにより行った。すなわち、ヘキサナールを３mg、内標準物質としてトリデカン0.1mgを含むジクロロメタン溶液１mlを遮光した５mlアンプル管に採取し、空気を通気したのち、封印した。次に、一定温度下で保存したサンプルを開封し、カプロン酸の生成量をGCで測定した。

２．GC分析

GCには島津GC-14A（島津製作所製）を用い、検出器は水素炎イオン化検出器を使用した。分離カラムはHiCap-CBP20（0.22mm i.d. x 50m、フィルム厚0.25μm、島津製作所製）を用い、カラム温度は50℃から200℃まで３℃/minで昇

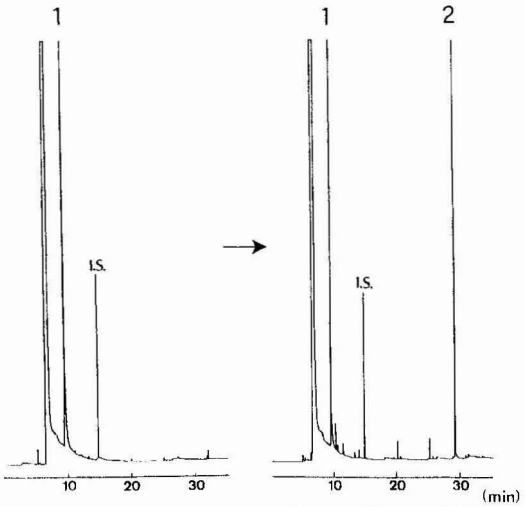

図１　酸化によるアルデヒドのカルボン酸への変化
１：ヘキサナール、２：カプロン酸、
I.S.（内標準）：トリデカン

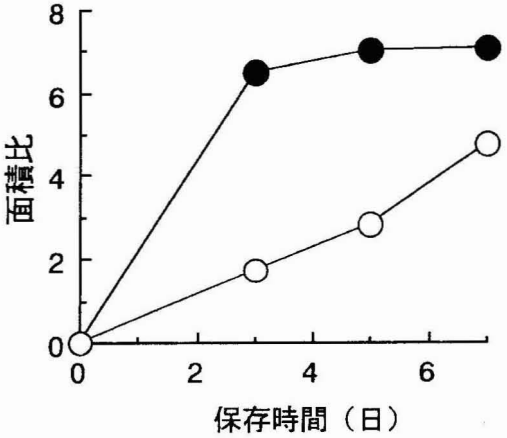

図２　保存温度の違いによるカプロン酸の生成
○：25℃、●：40℃

温した。注入口および検出器の温度は250℃、キャリアガスはヘリウムを使用し、スプリット比は１/30、カラム内線速度は30cm/secとした。カプロン酸の定量は内標準物質に対するピーク面積比とし、３回の分析の平均値として示した。

３．黒糖からの有機溶媒粗抽出物の調製

試料として1997年に宮古製糖（株）多良間工場で製造された黒糖を用いた。抽出は、ジクロロメタンを抽出溶媒とする液体・液体連続抽出法で行った。すなわち、黒糖110gを含む200ml水溶液をジクロロメタン75mlで６時間抽出し、10mgの粗抽出物を得た。

４．ロダン鉄法

リノール酸に対する抗酸化力の測定はOsawaらの方法に準拠した[3]。すなわち、試料0.2mgを含むメタノール溶液0.1mlをネジ口褐色バイアル10ml容に入れ、溶媒を除去後、リノール酸（東京化成）0.052mlを含むエタノール溶液0.8ml、0.05Mリン酸緩衝液（pH7.0）0.8ml、蒸留水0.4mlを加え反応液とした。この反応液は恒温器（40±２℃）に静置したのち、経時的に0.1ml採取し、75%エタノール4.7ml、30%チオシアン酸アンモニウム0.1ml、0.02M塩化第一鉄（3.5%塩酸溶液）0.1mlを加え撹拌、そして正確に３分後、500nmの吸光度を測定した。

結果および考察

１．サンプル調製およびGCによるカプロン酸の定量

水系においてアルデヒドは容易に酸化されてカルボン酸になることは周知のことであるが、溶媒系においてもこの反応が生じることが報告されている[4]。図１にサンプル調製直後および一定温度で保存後の代表的なガスクロマトグラムを示した。図からアルデヒドとして用いたヘキサナールは相当するカルボン酸であるカプロン酸へ酸化したことが示された。また１検体あたりの分析時間は約30分であった。ここで、酸化の程度の指標であるカプロン酸の生成量および速度は保存温度および保存期間に大きく影響することが考えられた。そこで、サンプルの保存温度として25℃および40℃を設定し、経時的にカプロン酸の生成を観察した。図２から明らかなように、25℃保存では７日目までカプロン酸の生成が直線的に増加したが、40℃保存では３日目以降生成量の増加はほとんど認められなかった。一方、保存温度を高めることにより保存期間、すなわち分析に要する時間は短縮されることが予想されたが、ジクロロメタンの沸点も考慮し、40℃保存を最適とした。

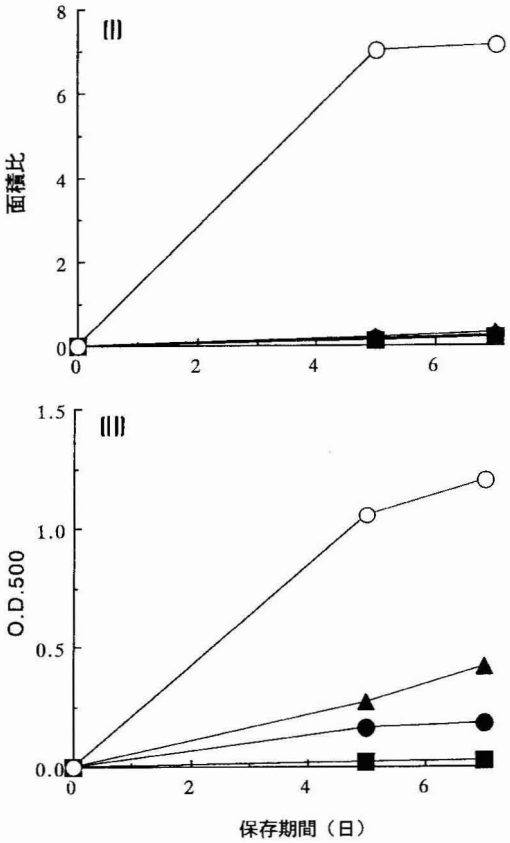

図３　アルデヒド・カルボン酸系（I）およびロダン鉄法（II）による抗酸化活性試料
濃度:100μg／ml
○：コントロール、▲：α-トコフェロール、■：BHA、●：黒糖抽出物

２．アルデヒド・カルボン酸系およびロダン鉄法による活性の測定

黒糖にはフェノール性の抗酸化物質が含まれることが、すでに報告されている[5]。一方、加熱食品の主要香気成分である複素環化合物にもラジカルスキャベンジ作用を有することが見い出されている[6, 7]。著者は黒糖水溶液からの有機溶媒による香気抽出物にも多くの複素環化合物が含まれていることを報告したが[8]、それらの抗酸化能については明らかになっていない。そこで、α-Toc、BHAおよび黒糖粗抽出物の抗酸化活性を本法およびロダン鉄法により測定、比較することにより、本法の有用性と黒糖の抗酸化能を検討した。図３に両手法による各試料

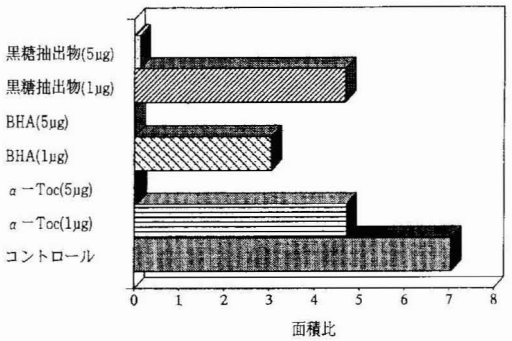

図４　アルデヒド・カルボン酸系での試料濃度に伴うカプロン酸生成量の変化　保存期間：５日

を含むサンプルの経時変化の結果を示した。なお、各試料の濃度は両手法とも100μg/mlとした。ロダン鉄法による結果から黒糖粗抽出物に抗酸化活性が確認されるとともに、活性の強さはα-Toc＜黒糖粗抽出物＜BHAであることが示された。Nakasoneら[9]は黒糖からの直接有機溶媒抽出で得られた単離物質の抗酸化活性をロダン鉄法による測定しているが、その結果と同様の傾向を示すものであった。一方、アルデヒド・カルボン酸系による結果からは黒糖粗抽出物が活性を有することは認められたが、強さの違いを明らかにすることはできなかった。そこで、各試料の濃度を５μg/ml、１μg/mlとして測定を行い、保存５日目の結果を図４に示した。図４からアルデヒド・カルボン酸系においても各試料の活性の強さは、ロダン鉄法の結果とほぼ一致しており、濃度１μg/mlで十分測定可能であることが明らかとなった。

以上のように、アルデヒド・カルボン酸系を用いた抗酸化活性測定法は非常に低濃度の試料で評価が可能であることから、多くの生物資源中の抗酸化性物質の一次スクリーニングの手法としての適用性が示唆された。また、オートサンプラー用バイアルでのサンプル調製、さらにガスクロマトグラフ用オートインジェクターを併用することにより測定の自動化も期待できると考える。

要　約

酸化によるアルデヒド（ヘキサナール）のカルボン酸（カプロン酸）への変化をガスクロマトグラフィーでモニターする抗酸化活性測定法を検討した。サンプルの保存温度は酸化によるカプロン酸の生成速度に大きく影響したことから、40℃に設定した。黒糖水溶液からのジクロロメタン粗抽出物の抗酸化活性を本法およびロダン鉄法を用いて測定した結果、両手法において活性が認められた。また、本法において試料濃度は1 μg/mlとロダン鉄法の1/100程度で十分であり、標準物質の活性評価もロダン鉄法とほぼ一致した。

文　献

1）越智宏倫：老化制御食品の開発（光琳、東京）、p.149-155（1995）.

2）川岸舜朗：生物化学実験法、食品中の生体機能調節物質研究法（学会出版センター、東京）、p.14（1996）.

3）Osawa, T. and Namiki, M. A novel type of antioxidant isolated from leafwax of eucalyptus leaves.: *Agric.Biol.Chem.*, **45**, 735-739 (1981).

4）Nonhebel, D.C., Tedder, J.M., and Walton, J.C.: Radicals. (Cambridge University Press, London), p.157 (1979).

5）高良健作、松井大吾、和田浩二、仲宗根洋子、黒糖より分離した抗酸化物質：南方資源利用技術研究会誌、**15**, 11-15（1999）.

6）Mahanti, M.K. Simple molecular orbital calculations in the structural elucidation of organic molecules. Perturbations of heterocyclic systems.: *Ind. J. Chem.*, **15**, 168-174 (1977).

7）Eiserich, J.P. and Shibamoto, T. Antioxidative activity of volatile heterocyclic compounds.: *J.Agric.Food Chem.*, **42**, 1060-1063 (1994).

8）和田浩二：沖縄産黒糖の製造工程における化学成分および香気成分の変化：FFIジャーナル、No.156, 58-65（1993）.

9）Nakasone, Y., Takara, K., Wada, K., Tanaka, J., Yogi, S. and Nakatani, N., Antioxidative compounds isolated from Kokuto, non-centrifugal cane sugar.: *Biosci.Biotech. Biochem.*, **60**, 1714-1716 (1996).