

## サンプル抽出液中に含まれるビタミンCが DPPH抗酸化活性に及ぼす影響

— メロンとプルーンを用いた事例 —

大池奈津希\*・川俣幸一

The Effects of Vitamin C Concentration in Extraction

Solvent on DPPH Radical

— Scavenging Activity in Melons and Prunes —

Natsuki OHIKE\* and Koichi KAWAMATA

**Abstract :** There are many reports which indicate a significantly positive correlation between the anti-oxidization activity and the total amount of polyphenol in fruit and vegetables, but there are few papers that describe the vitamin C concentration in sample extraction solvent. The purpose of this study was to determine correlation between the vitamin C and the anti-oxidization activity in various experimental conditions. Fruit used in the experiments included melons and prunes which were locally produced in the southern Nagano area of Japan. The edible portion of each fruit and vegetables was cut into the sample (melon peel nothing, prune peel attached). Melons, which had been peeled, and unpeeled prunes were cut into pieces. Distilled water, 50% hydrous methanol, 100% methanol, and 1% HCl-methanol were used as a polyphenol extracting solvent. The HPLC method was utilized to measure vitamin C concentrations of the sample fruit. Anti-oxidization activity analysis was performed using a spectrogram photometer to measure the  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. Total polyphenol content was measured by Folin-Ciocalteu method.

In conclusion, if more than 0.5-1mg/100mL of reduced vitamin C concentration was dissolved in sample extraction solvent, it indicated that there was a significantly positive correlation between vitamin C and anti-oxidization activity in polyphenol experiment. Also, in the sample extraction solvent which did not contain vitamin C, 1% HCl-methanol had a better extraction result compared with distilled water.

**Key words :** Vitamin C (ビタミンC), DPPH, polyphenol (ポリフェノール), extraction solvent (抽出溶媒)

### 緒 言

青果物(野菜や果物)の持つ三次機能の一つに抗酸化能力があり、これまでも $\alpha, \alpha$ -

diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性法などの抗酸化測定法を用いた報告が国内に多数ある。その研究の多くが、抗酸化能力と総ポリフェノール量に有意な正の

---

2012年4月17日受付；2012年7月26日受理

\* 前飯田女子短期大学助手

論文責任者 家政学科 食物栄養専攻 川俣幸一 E-mail : kawamata@iidawjc.ac.jp

一次相関がある事を示している<sup>1-6)</sup>。一方、野菜や果物に含まれるビタミンCも抗酸化能力を有することが知られており、ビタミンCとポリフェノールは区別して論じる必要がある。これまでのいくつかの先行研究では、石渡らが市販飲料を対象にDPPH抗酸化活性とビタミンCを共測定しビタミンCの抗酸化活性に対する寄与率が果実飲料や野菜飲料などで20～70%である事を示し<sup>7)</sup>、森山らもスプラウト類を対象にビタミンCの寄与率が緑豆もやしで57%、アルファルファもやしで16%であったと報告している<sup>8)</sup>。他方、藤江らは新鮮ハーブを対象に測定を行いDPPH抗酸化活性とビタミンCとの間に相関関係はなかったと報告している<sup>9)</sup>。しかしながら、これら研究は対象物そのものに含まれるビタミンCを分析対象としており、サンプル抽出液中に含まれるビタミンC濃度にまで踏み込み抗酸化能力と総ポリフェノール量との関係を論じているものではない。すなわち、ポリフェノール分析においてサンプル抽出液中のビタミンCはDPPH抗酸化活性における共雑物となるため、存在する濃度を十分に検討した上で一次相関や寄与率などを示す必要がある。

今回我々は、ビタミンCを含む青果物としてメロンを、含まないものとしてプルーンを使用し、サンプル抽出液中に存在するビタミンCが共雑物としてポリフェノール測定にどの程度影響を与えるのか明らかにする目的で基礎的な実験を行った。その結果を報告する。

## 方 法

### 1. 実験材料

2009年9月に長野県南部地域で収穫された青果物のうち、ハウスメロン（アールスメロン：飯田産）とプルーン（プレジデント：飯田産）を使用した。

### 2. サンプル抽出液の作成方法

各青果物の可食部を試料とした（メロン皮

無し、プルーン皮付き）。メタノールは特級（99.8%、純正化学）を使用し便宜上100%と表現した。ポリフェノール抽出溶媒としての検討も併せて行い、蒸留水、50%含水メタノール、100%メタノール、1%塩酸-メタノールを使用した。基本的なサンプル処理方法はこれまで平井らが行ってきた前報を参考とし実施した<sup>10)</sup>。測定手順を以下に簡潔に述べる。まず試料10.0gに抽出溶媒を加えた後ミルサーにて磨砕、遠心分離（4,000rpm、5分）後、上澄みを採取した。沈殿物に再度抽出溶媒を加え攪拌、遠心分離を行い再度上澄み液を採取した。この操作を3度繰り返し、採集した上澄み液を抽出溶媒にて100mLにメスアップし、最終的なサンプル抽出液とした。

### 3. ビタミンCの測定方法

ビタミンC（還元型）の測定はShimadzuのHPLC法に準じて行った前法と同様に実施した<sup>11,12)</sup>。以下に簡潔に述べる。移動相：A液（蒸留水800mL、リン酸2水素カリウム1.4g、10%テトラブチルアンモニウムヒドロキシド26mLを混和後、リン酸でpH5.2に調整し1,000mLにしたもの）とB液（アセトニトリル）を9対1の割合で混合したもの。流速：0.8mL/min。カラム：ODS（CrestPak C18 S, 日本分光）。カラム温度：40°C。UV検出：260nm。標品にはビタミンC（特級、純正化学）を用い、結果はmg/100mL（サンプル抽出液）で示した。検量線はそれぞれの溶媒毎に作成した。

### 4. 抗酸化活性ならびに総ポリフェノール量の測定方法

抗酸化活性（DPPHラジカル消去活性）の測定については、成書ならびに前報を参考とし実施した<sup>12,13)</sup>。DPPH試薬はSigma社のものを用いた。緩衝液には0.1M Tris-HCl bufferを用いた。測定手順を以下に簡潔に述べる。10倍に薄めたサンプル抽出液0.5mLに対し、0.1M Tris-HCl buffer 2.0mLならびに0.1mM DPPH-EtOH溶液2.5mLを混合した後、暗所

室温にて30分静置後、517nmにて吸光度測定を行った。総ポリフェノール量の測定についても、成書ならびに前報を参考とし実施した<sup>12,13)</sup>。フォーリン試薬はナカライテスク社のフォーリンチオカルト試薬を用いた。測定手順はサンプル抽出液0.5mLに対し、0.1M Tris-HCl buffer 3.0mLとフォーリンチオカルト試薬0.5mLを混合、3分後に10%炭酸ナトリウム溶液を1.0mL加え再混合した。暗所室温にて60分静置後、760nmにて吸光度測定を行った。抗酸化活性測定ならびに総ポリフェノール量の標品にはクロロゲン酸（特級、純正化学）を使用し、結果はサンプル抽出液100mLあたりのクロロゲン酸当量で示した。検量線はそれぞれの溶媒毎に作成した。

## 5. 統 計

実験結果は平均値±標準誤差で示した。検定処理はpaired t-test（両側検定）による、水抽出液の結果を基準とした他抽出液に対する単純比較とした。またそれぞれの項目においてはPearsonの相関分析を実施した。統計ソフトにはSPSS17.0 for Windows（SPSS社）を使用し、危険率5%以下をもって有意とした。

## 結果および考察

### 1. 各サンプル抽出液に含まれる

#### ビタミンC濃度

食品成分表によると生のハウスメロン（アールスメロン）のビタミンCは100gあたり18mg

となっている<sup>14)</sup>。一方、生のプルーンは4mgと比較的少ない。成分表の結果は総ビタミンCで表記されているが、実際に全てのビタミンCが還元型として検出されたと仮定して本結果を検討すると（理論値を導くと）、サンプル10.0gに含まれるビタミンCを最終的に100mLにメスアップするため、サンプル抽出液に含まれるビタミンC濃度はメロンであれば1.8mg/100mL、プルーンであれば0.4mg/100mLとなる。今回の各サンプル抽出液に含まれるビタミンC濃度を表1に示した。抽出液により違いはあるがメロン抽出液に含まれるビタミンC濃度は0.01~0.62mg/100mLであった。プルーンにおいては検出されなかった（ほぼ痕跡のみ）。これらの原因として、品種や収穫時期による差異も考えられるが、実際には実験操作中に還元型ビタミンCの酸化や破壊などが生じ、上述した理論値と大きく乖離した結果となっているものと考えられる。しかしながら、これらの抽出溶媒ならびに抽出手法はビタミンC定量のための手法ではなくポリフェノール抽出のためのものであり、今回の結果は少なくともいくつかの抽出サンプル・抽出手法によってはサンプル抽出液内にビタミンCが含まれていることを示していた。なお、2時間後に再測定を行ってもHPLCのピークに殆ど変化が見られなかった（データ未提示）。この事は本測定条件下においてサンプル抽出液中の還元型ビタミンCが2時間は安定であったことを意味している。

表1 各サンプル抽出液に含まれるビタミンC濃度  
(mg/サンプル抽出液100mL) (n = 3)

抽 出 液	ビタミンC濃度	
	メ ロ ン	プ ル ー ン
蒸 留 水	0.01 ± 0.00	Tr.
50%含水メタノール	0.01 ± 0.00	Tr.
100%メタノール	0.62 ± 0.26	Tr.
1%塩酸-99%メタノール	0.42 ± 0.24	Tr.

数値は平均値±標準誤差を示す

大池・川俣：サンプル抽出液中に含まれるビタミンCがDPPH抗酸化活性に及ぼす影響

表2 各サンプル抽出液中に含まれるDPPH抗酸化活性と総ポリフェノール量  
(mgクロロゲン酸当量/サンプル抽出液100mL) (n = 3)

抽出液	DPPH抗酸化活性		総ポリフェノール量	
	メロン	ブルーベリー	メロン	ブルーベリー
蒸留水	0.50 ± 0.25	0.91 ± 0.08	4.22 ± 0.29	11.68 ± 0.61
50%含水メタノール	0.27 ± 0.27	0.97 ± 0.09	4.69 ± 0.69	16.30 ± 1.61*
100%メタノール	0.91 ± 0.09	1.66 ± 0.08**	3.87 ± 0.21	21.45 ± 1.19*
1%塩酸-99%メタノール	0.58 ± 0.16	2.23 ± 0.17**	4.99 ± 0.15*	28.17 ± 2.01**

数値は平均値±標準誤差を示す

\*...p<0.05, \*\*...p<0.01 (同実験・同青果物において蒸留水の結果と比べて有意差があることを示す)

## 2. 各サンプル抽出液中の抗酸化活性と

### 総ポリフェノール量

表1で使用したサンプル抽出液を用いて、抽出液中の抗酸化活性と総ポリフェノール量を定量した(表2)。メロンにおいて、蒸留水抽出(0.50±0.25mg/100ml)と比較して有意差が見られなかったものの、抗酸化活性が最も高かったのは100%メタノール抽出であった(0.91±0.09mg/100ml)。しかしながら総ポリフェノール量においては1%塩酸-99%メタノール抽出(4.99±0.15mg/100ml)が蒸留水抽出(4.22±0.29mg/100ml)と比較して有意に高かった(p=0.040)。100%メタノール抽出は最も低い値を示した(3.87±0.21mg/100ml)。すなわちメロンについては必ずしも抗酸化活性と総ポリフェノール量との傾向が一致しなかった。一方、ブルーベリーにおいては、蒸留水と比較して、メタノール割合が高いケースで抽出量が有意に増加した。また1%塩酸-99%メタノールにおいては更なる抽出量の増加が確認され、抗酸化活性と総ポリフェノール量との傾向が一致した。

## 3. 各サンプル抽出液中のビタミンC、抗酸化活性、総ポリフェノール量における相関

ここまでの知見を確認するため、ビタミンC、抗酸化活性、総ポリフェノール量における相関分析を実施した。メロンにおいて、総ポリフェノール量では観察されなかったもののビタミンC濃度と抗酸化活性において有意

な正の相関(r=0.592, p=0.042)が確認された(図1-A, 図1-B)。この相関は低濃度(0~0.5mg/100mL)においてはバラつきが多かったものの、概ね0.5~1mg/100mL以上の高濃度になるにつれて顕著な正の相関を示す傾向にあった。一方、抗酸化活性と総ポリフェノール量においては有意な相関は見られなかった(図1-C)。ビタミンCがDPPH抗酸化活性を有する事は以前より知られた知見であり<sup>7-9)</sup>、サンプル抽出中にビタミンCが殆ど含まれなかったブルーベリーにおいて顕著に観察される抗酸化活性と総ポリフェノール量との有意な正の一次相関(r=0.940, p<0.000)であるが(図1-D)、メロンにおいてはビタミンCが共雑物(原因物質)となり相関関係を示せないものと考えられる。なお、ビタミンEも抗酸化作用を有する食品成分であるが、青果物に含まれる量はビタミンCよりも更に少ないため<sup>14)</sup>、検討から除外している。

結論として、今回の我々の結果はいくつかのサンプル抽出方法(抽出液)において、抗酸化活性や総ポリフェノール量を測定する際にはサンプル中のビタミンC濃度が概ね0.5~1mg/100mL以上を満たすとき、分析条件を再考する必要性を示していた。一般に野菜や果実を用いたポリフェノール実験を行う際には、分析試料の作成に加熱処理や凍結乾燥などビタミンCが破壊されるような処理を行う事が多いが<sup>2-6)</sup>、場合によっては分析試

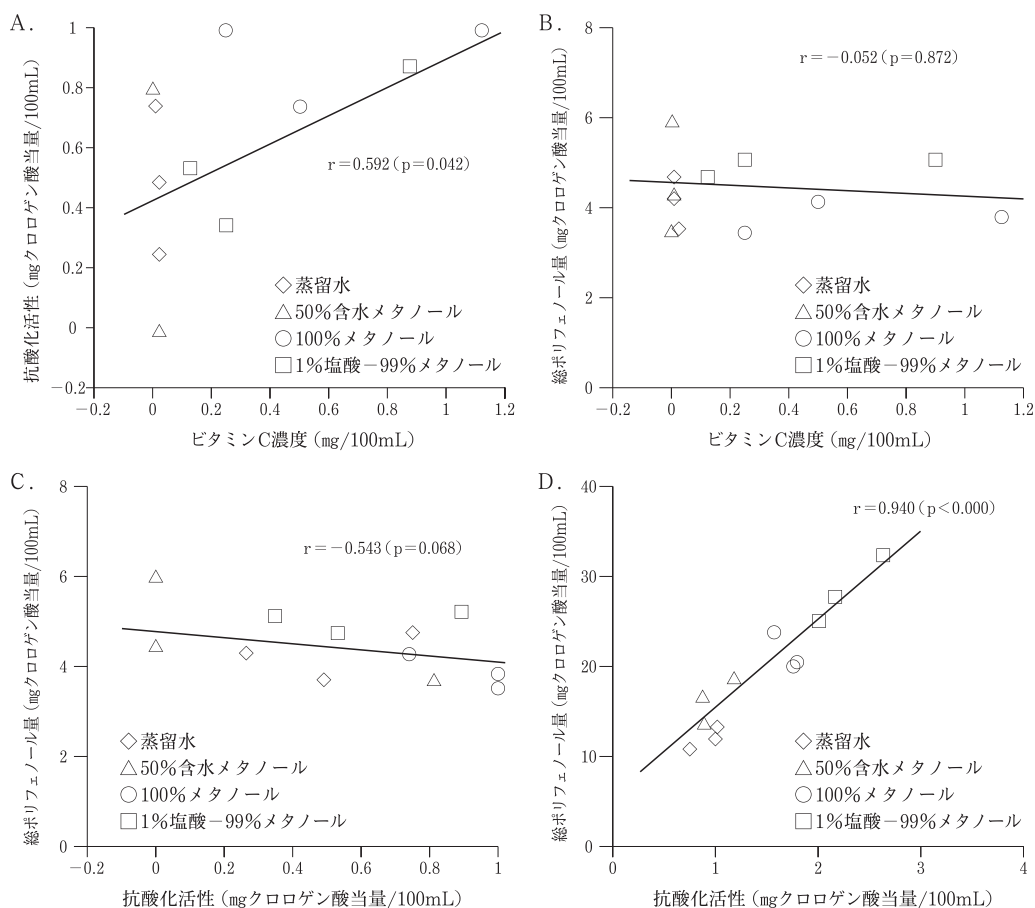


図1 サンプル抽出液中のビタミンC, 抗酸化活性, 総ポリフェノール量における相関関係

A～C: メロン抽出液, D: ブルーン抽出液.

メロン抽出液に含まれるビタミンCは抗酸化活性と有意な正の相関を示した(A). しかし総ポリフェノール量とは無相関を示した(B). 一方, 抗酸化活性と総ポリフェノール量との相関において, メロン抽出液では両者に有意差は確認されなかったものの(C). ブルーン抽出液では非常に強い有意な正の相関が確認された(D).

料のビタミンC含有量(または最終サンプル濃度)に注意を払う必要がある.

最後に本研究の限界点を述べる. 1) 長野県南部地域で栽培されている青果物のうち比較的ビタミンC含有量の少ない2品種でしか分析を行っていないこと. 2) 酸化型ビタミンCについての検討を行っていないことである. しかしながら3つの実験の共測定によりサンプル抽出液中のビタミンC濃度(概ね0.5~1 mg/100mL以上)を考慮する必要性を明確にした報告であり, 抗酸化活性測定(ポリフェノール測定)系における一資料として本報告

は有用であると思われる. 今後はビタミンC含有量が比較的多い青果物でも同様の結果となるのかを, 還元型ならびに酸化型ビタミンCを両測定し, 分析を試みる必要があると考えられる.

## まとめ

長野県南部地域で栽培される青果物(メロンとブルーン)を用いて, 抗酸化活性に影響を及ぼすポリフェノール抽出法における検討を行った. その結果, 還元型ビタミンCを含まないサンプル抽出液においては, 蒸留水と

比べ1%塩酸-メタノールが最も抽出成績が良かった。結論として、サンプル抽出液中に還元型ビタミンCが概ね0.5~1 mg/100mL以上含まれる場合、抗酸化活性測定において注意を払う必要性が示唆された。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり多大なるご理解とご協力をいただきました元食品学研究室主任教授である平井俊次先生に心より感謝申し上げます。また静岡県立大学の渡辺達夫先生には抗酸化活性測定法<sup>13)</sup>のご指導を賜りました、ありがとうございました。

## 文 献

- 1) 石渡仁子, 高村仁知, 的場輝佳: 市販アルコール飲料のDPPHラジカル捕捉活性. 日本調理科学会誌, **34**, 407-417, 2001.
- 2) Hamauzu, Y & Sakai, I.: Changes in polyphenolic compounds and antioxidant functions in 'Bartlett' pear fruits during storage and postharvest ripening. *Food Preservation Science*, **28**, 25-32, 2002.
- 3) 石渡仁子, 高村仁知, 的場輝佳: 干柿の製造過程におけるラジカル捕捉活性の変化. 日本家政学会誌, **54**, 449-456, 2003.
- 4) 柴田圭子, 渡邊容子, 根岸由紀子, 安原安代: サツマイモのクロロゲン酸誘導体およびDPPHラジカル捕捉活性に及ぼす加熱調理の影響. 日本調理科学会誌, **38**, 324-332, 2005.
- 5) 立山千草, 五十嵐喜治: ナス果菜の栽培品種・部位別のアントシアニン量, クロロゲン酸量およびラジカル消去活性. 日本食品科学工学会誌, **53**, 218-224, 2007.
- 6) 木村英生, 長沼孝多, 小嶋匡人, 小松正和, 恩田匠, 辻政雄: 山梨県産果実の総ポリフェノール含量とそのDPPHラジカル消去活性. 山梨県工業技術センター研究報告, **22**, 59-63, 2008.
- 7) 石渡仁子, 高村仁知, 的場輝佳: 市販飲料のDPPHラジカル捕捉活性. 日本調理科学会誌, **33**, 483-493, 2000.
- 8) 森山三千江, 大羽和子: スプラウト類のビタミンC量, ラジカル捕捉活性および豆苗子葉部の調理性. 日本家政学会誌, **55**, 153-158, 2004.
- 9) 藤江歩巳, 久保田真紀, 梅村芳樹, 大羽和子: 新鮮ハーブのビタミンC量, DPPHラジカル捕捉活性およびポリフェノール量. 日本調理科学会誌, **34**, 34-43, 2001.
- 10) 平井俊次, 千裕美, 近藤民恵, 川俣幸一: 加熱処理が果実のポリフェノール化合物に与える影響. 飯田女子短期大学紀要, **23**, 75-95, 2006.
- 11) HPLC 島津アプリケーションニュース No.L317: 食品中L-アスコルビン酸2-グルコシドの分析<<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/n/search/a-lc.htm>>
- 12) 大池奈津希, 川俣幸一: 果実ポリフェノール量および抗酸化活性への電子レンジ加熱, 湯煮加熱(ブランチング)の影響. 栄養学雑誌, **70**, 207-212, 2012.
- 13) 渡辺達夫, 森光康次郎編著: 健康を考えた食品学実験, アイ・ケイコーポレーション, 神奈川, 2004, pp.112-123.
- 14) 香川芳子監修: 食品成分表改定最新版 ー本表編ー, 女子栄養大学出版部, 東京, 2011, pp.88-107.