

大麦中の抗酸化活性の評価およびフェノール性有機酸含量の測定

園田 啓介¹⁾ 吉田 淳子²⁾ 橋本 俊二郎²⁾ 太田 英明³⁾

Evaluation of Antioxidant Activities and Determination of Phenolic Acids in Barley

Keisuke Sonoda¹⁾ Atsuko Yoshida²⁾ Shunjiro Hashimoto²⁾ Hideaki Ohta³⁾
(2010年11月26日受理)

緒 言

近年、わが国で増加傾向にあるガン、冠動脈疾患、糖尿病などの生活習慣病は、脂質摂取量の増加、穀類や野菜の摂取不足による食物繊維摂取量の減少など、食習慣の変化が要因の一つとして考えられており、これらの疾病の予防には日常の食生活の改善が重要であると考えられている。

主に主食として摂取されている穀類はデンプンを中心としたエネルギー源となっており、また未精製の穀類においてはビタミン類や食物繊維が多く含まれ様々な作用が報告されている^{1, 2)}。さらに穀類中にはフェルラ酸など抗酸化作用を有するフェノール性有機酸が含まれており LDL - コレステロールの酸化抑制や、血中脂質上昇抑制などの生理機能性が報告されている^{3, 4)}。そのため、2007年に「世界ガン研究基金」がまとめた「食品、栄養、運動とガン予防—世界的展望」において、慢性疾患やガン予防の見地から、精製度の低い穀類の摂取が推奨されている⁵⁾。

穀類の一種である大麦は、ビール、麦茶、味噌、麦ご飯など、その用途は多岐にわたる。大麦は米や小麦などの穀類と比較してビタミン類や食物繊維を豊富に含有している¹⁾。さらに大麦にはカテキンやその重合体であるプロアントシアニジンなどのポリフェノール成分が含まれており、それらが強い抗酸化性や抗変異原性を持つことが報告されている⁶⁻⁸⁾。

本研究では穀類中のフェノール性有機酸に関する調査の一環として、大麦を胚乳部と糠層に分別し、抗酸化活性の検討を行った。さらに総水溶性ポリフェノール含量および結合性フェノール性有機酸含量を測定し、抗酸化活性との関連を調査した。

実験方法

1. 実験材料および試薬

近畿中国四国農業研究センターより提供された10種類の大麦（関東皮87号、東山皮107号、関東二条40号、関系 n552、関系 n553、関系 n554、大系 HQ10、エルローズ、スカイゴールデン、スカーレット）を試料として使用した。大麦の籾殻を剥皮後、小型精米器パーレスト（Kett 科学社製）を用いて胚乳部が60%重量になるまで搗精を行った。胚乳部と糠層を遠心粉碎器 ZM200（Retsch 社製）にて粉碎し、測定に供するまで -20℃で保存した。

2. 水溶性抗酸化成分の抽出

試料中の水溶性抗酸化成分の抽出は沖らの方法に準じ行った⁹⁾。すなわち、大麦粉末試料（0.5g）を海砂とともに専用セルに充填後、高速溶媒抽出装置 ASE200（Dionex 社製）を用いてヘキサン：ジクロロメタン（1：1）（溶媒を抽入して70℃で5分間静置後、1500 psi の圧力で60秒間パージを3回繰り返す）で脂溶性成分の抽出を行った。その後、80℃でアセトン：水：酢酸（70：29.5：0.5）（以下この混合溶媒を AWA と略す）にて水溶性成分を抽出し、得られた AWA 抽出液を25ml に定容し、測定試料とした。

3. DPPH ラジカル消去能の測定

大麦中の DPPH ラジカル消去能は沖らの方法¹⁰⁾を一部改変して用いた。AWA 抽出液に30%アセトンを当量混合し（糠層は50%アセトンにてさらに5倍希釈した）、96 well マイクロプレート（ファ

ルコン社製)に調製したAWA混合液 $100\mu\text{l}$, 200mM MES緩衝液(pH 6.0) $50\mu\text{l}$, $800\mu\text{M}$ DPPH溶液 $50\mu\text{l}$ をそれぞれ分注後、攪拌混合した。室温にて20分間放置し、マイクロプレートリーダーMultiscan JX(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を用いて 520nm の波長にて測定を行った。測定結果はラジカル消去能を有するTrolox当量($\mu\text{mol-TE}/100\text{g}$)に換算・表示した。

4. 総水溶性ポリフェノール含量

総水溶性ポリフェノール含量測定にはフォーリンチオカルト法を用いた¹¹⁾。AWA抽出液 1ml を分注後、 10% フォーリンチオカルト試薬 5ml を添加し $3\sim 8$ 分間放置した。 7.5% 炭酸ナトリウム溶液 4ml 分注し 60 分間放置後、 765nm の波長にて測定を行った。測定結果は没食子酸当量($\text{mg-GAE}/100\text{g}$)に換算・表示した。

5. 結合性フェノール性有機酸の抽出

胚乳部 0.5g にヘキサン 15ml を加え 30 分間攪拌し、遠心分離後(3000rpm , 15 分間)、ヘキサン層を取り除く操作を4回繰り返した。次に 80% エタノール 15ml を加え同様の操作を行い、沈殿物に窒素ガス乾燥を行った。この沈殿物に 1M 水酸化ナトリウム 30ml を加え、さらに窒素ガスで置換後、 120 分間攪拌によってケン化処理を行い、遠心分離後(3000rpm , 15 分間)、上清を回収する操作を2回繰り返した。上清に 4M 塩酸を加えpH 1に調製後、酢酸エチル 300ml にて抽出を行った。回収した酢酸エチルを濃縮・乾固し、 15% メタノール 2ml に再溶解後、シリンジフィルター(保留粒子径 $0.45\mu\text{m}$) (Advantec社製)でろ過しHPLC分析に供した。

糠層では試料 0.2g に対して、ヘキサン 10ml , 80% エタノール 10ml , 1M 水酸化ナトリウム 15ml , 酢酸エチル 120ml , 15% メタノール 6ml に試薬の量を変更し、上記と同様の方法で抽出、分析を行った。

6. HPLC 分析

HPLC分析に使用した装置は島津社製を用い、デガッサー DGU-20A₃, ポンプ LD-10AT, オートインジェクター SIL-AXL, カラムオープン CTO-10A, 電気化学検出器は ED62 (ジーエルサイエンス社製)を使用した。カラムは COSMOSIL 5C₁₈-AR-II ($\phi 4.6\times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$)を使用し、カラム温度 35°C , 注入量 $20\mu\text{l}$, 流速 $1.0\text{ml}/\text{min}$, 電圧 500mV で分析した。移動相は 100mM リン酸二水

素ナトリウム (pH 3.1) - SDS ($10\text{mg}/\text{L}$) - EDTA・2Na ($10\text{mg}/\text{L}$) - 10% アセトニトリルを用い、分析時間 60 分間とした。標準品としてカフェ酸, p-クマル酸, フェルラ酸およびシナピン酸 (いずれもシグマアルドリッチジャパン, 東京) の4種を使用し、それぞれ 15% メタノールに溶かし標準溶液とした。

相関関係の検定は統計ソフト SPSS (Ver. 17.0)を用いて行い、ピアソンの相関係数を求めた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

実験結果および考察

1. DPPH ラジカル消去能

DPPHは 517nm に最大波長をもつ安定したラジカルである。DPPHラジカル消去能は多種の穀類抽出物中の抗酸化成分の抗酸化活性を測定するのに広く用いられている^{12, 13)}。大麦試料のDPPHラジカル消去能の結果を図1に示した。全ての試料でDPPHラジカル消去能が確認され、また胚乳部と比較して糠層は約 6.7 倍高い活性を示した。最も活性が高かった試料は関係n552で、胚乳部が $1406\mu\text{mol-TE}/100\text{g}$, 糠層が $6015\mu\text{mol-TE}/100\text{g}$ であった。

関係n552, 関係n553および関係n554の3系統はその他の試料と比較して胚乳部, 糠層ともに高い活性が確認された。関係の試料の平均値はその他の試料の平均値に比べ、胚乳部では約 2.5 倍, 糠層では 1.3 倍高い値となった。

2. 総水溶性ポリフェノール含量

大麦試料の総水溶性ポリフェノール含量を図2に示した。DPPHラジカル消去能の結果と同様、糠層に多く含まれており、胚乳部と比較して約 3.6 倍高い値を示した。含量が最も多かった試料は胚乳部では関係n552および関係n553で $284\text{mg-GAE}/100\text{g}$, 糠層では関係n552で $862\text{mg-GAE}/100\text{g}$ となった。

DPPHラジカル消去能と同様、関係の試料に多く含有しており、関係の試料の総水溶性ポリフェノール含量の平均はその他の試料に比べ、胚乳部では約 1.5 倍, 糠層では 1.1 倍高い結果となった。

3. 結合性フェノール性有機酸含量

結合性フェノール性有機酸の分析結果を図3に示した。HPLC分析によりカフェ酸, フェルラ酸, シナピン酸が検出された。カフェ酸およびフェルラ酸はDPPHラジカル消去能, 総水溶性ポリフェノール

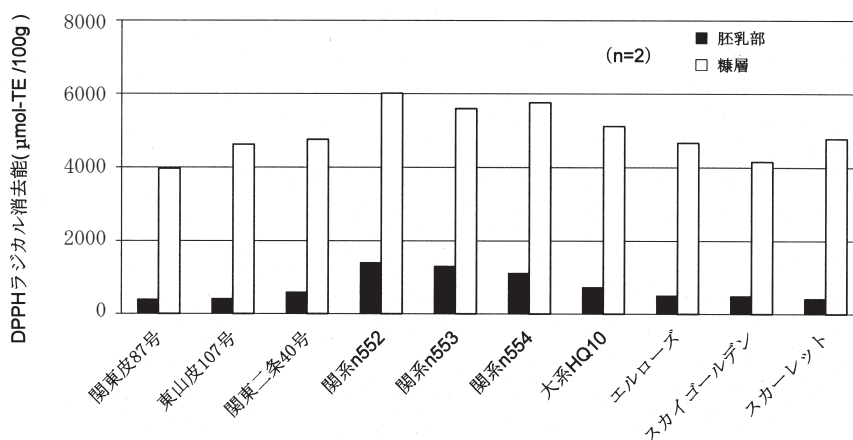


図1 大麦胚乳部と糠層における DPPH ラジカル消去能

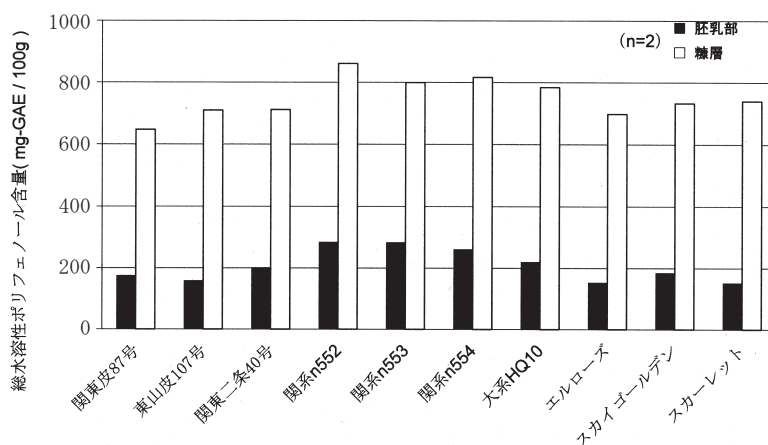


図2 大麦胚乳部と糠層における総水溶性ポリフェノール含量

含量の結果と同様、糠層に多く含まれており、胚乳部と比較してカフェ酸は8.4倍、フェルラ酸は15.2倍多い結果であった。カフェ酸の含量が最も多かった試料は胚乳部では関系 n552が0.015mg/100g、糠層では関東皮87号が0.072mg/100gであった。フェルラ酸含量が最も多かった試料は胚乳部、糠層ともに関系 n553（それぞれ34.2mg/100g, 321.4 mg/100g）であった。Qui ら¹⁴⁾ および Tian ら¹⁵⁾ も穀類中の抗酸化活性、フェノール性有機酸含量は糠層に高い値を示すことを報告している。シナピン酸は胚乳部のみから検出され、関系 n553が最も高い含量を示した (0.399mg/100g)。大麦試料中でフェルラ酸含量が最も多く、最も含量の少なかったカフェ酸と比較して胚乳部では約3000倍、糠層では約5000倍であった。

また、関系のフェルラ酸含量は他の試料と比較して胚乳部では4.7倍、糠層では約1.8倍であり、関系の試料に多く含有する傾向を示した。

4. 抗酸化活性とフェノール性有機酸含量の相関

今回測定した結果の相関図を図4に示した。DPPH ラジカル消去能と総水溶性ポリフェノール含量の間には高い正の相関が認められた ($r = 0.996$, $p < 0.01$)。また、DPPH ラジカル消去能と結合性フェルラ酸の間においても高い正の相関となった ($r = 0.898$, $p < 0.01$)。今回検出された結合性フェノール性有機酸はケン化処理により遊離するため、直接抗酸化性に影響を与えているとは考えにくい。しかし、高い相関性が確認されたことにより大麦の抗酸化活性には総水溶性ポリフェノールのみならず、結合性フェノール性有機酸も寄与していることが示唆された。

要 約

穀類中の抗酸化性に関する調査の一環として、大麦10種類の DPPH ラジカル消去能の評価を行った。

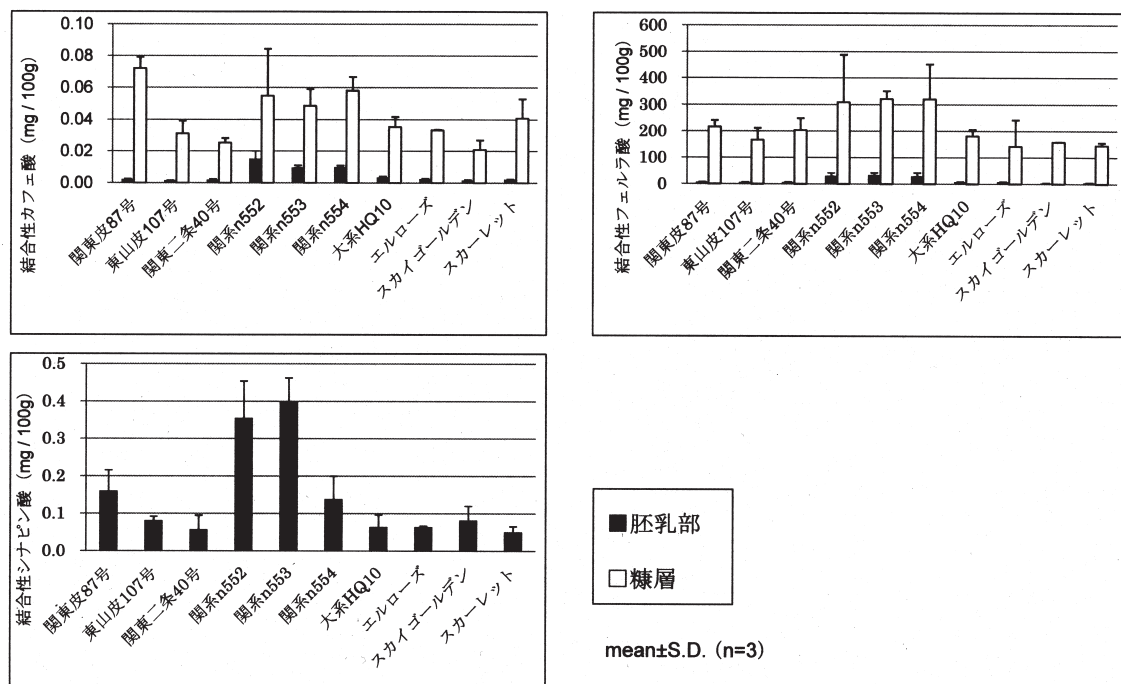


図3 大麦胚乳部と糠層における結合性フェノール性有機酸含量

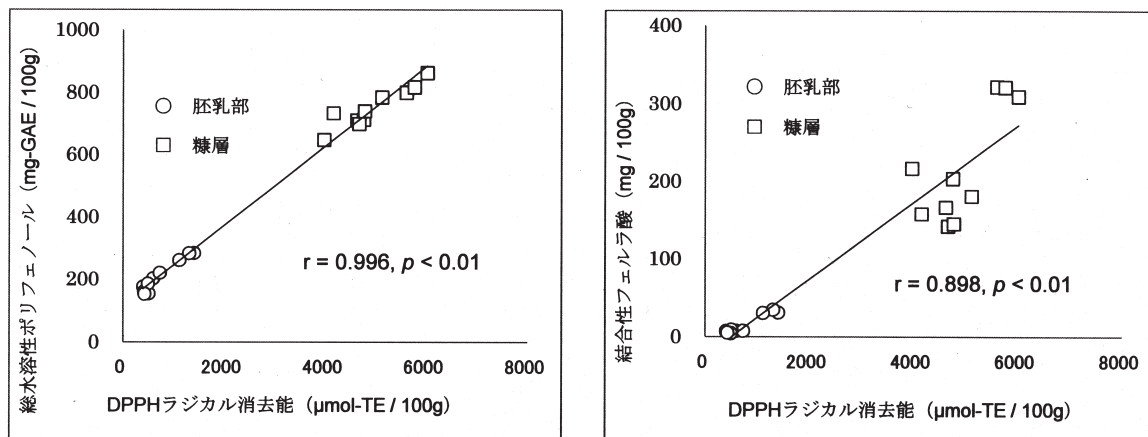


図4 DPPH ラジカル消去能および総水溶性ポリフェノールと結合性フェルラ酸との相関図

またフォーリンチオカルト法による総ポリフェノール含量の測定および、HPLC 法を用いて結合性フェノール性有機酸の分析を行い、抗酸化活性との関連を調べた。DPPH ラジカル消去能は糠層が胚乳部と比較して約6.7倍高い値を示し、総水溶性ポリフェノール含量においても、糠層が3.6倍多く含有する結果となった。結合性フェノール性有機酸は胚乳部ではカフェ酸、フェルラ酸およびシナピン酸が、糠層からはカフェ酸およびフェルラ酸が検出された。カフェ酸およびフェルラ酸は上記の結果と同様、糠層に多く含有されており胚乳部と比較して

カフェ酸は8.4倍、フェルラ酸は15.2倍多い結果となった。DPPH ラジカル消去能、総水溶性ポリフェノール含量および結合性フェルラ酸含量において関系 n552, 関系 n553, 関系 n554 の 3 試料が高い値を示した。今回の結果の相関関係をみたところ、DPPH ラジカル消去能と総ポリフェノール含量には高い正の相関が確認された ($r = 0.996, p < 0.01$)。また、DPPH ラジカル消去能と結合性フェノール性有機酸の一種であるフェルラ酸含量との間にも高い正の相関がみられたことから ($r = 0.898, p < 0.01$)、フェルラ酸も大麦の抗酸化活性に寄与して

いることが示唆された。

文 献

- 1) 食品成分研究調査会編, 「五訂増補 日本食品成分表」 医歯薬出版, pp16-25 (2006)
- 2) 児玉俊明, 椎葉究, 辻啓介, 高血圧自然発症ラットにおける小麦フスマヘミセルロースの血圧上昇抑制効果. 日本栄養・食糧学会誌, 49, 101-105 (1996)
- 3) Ohta, T., Semboku, N., Kurachi, A., Egashira, Y. and Sanada, H., Antioxidant activity of corn bran cell-wall fragments in the LDL oxidation system. J. Agric. Food Chem., 45, 1644-1648 (1997)
- 4) Balasubashini, S. M., Rukkumani, R., Viswanathan, P. and Menon, P. V., Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. Phytother. Res., 18, 310-314 (2004)
- 5) 世界ガン研究基金, 食品, 栄養, 運動とガン予防－世界的展望. (<http://www.dietandcancerreport.org/?p=ER>)
- 6) 玉川浩司, 飯塚崇史, 池田彰男, 小池肇, 長沼慶太, 小宮山美広, 大麦糠プロアントシアニジンの抗酸化性. 日本食品科学工学会誌, 47 (2), 106-110 (1999)
- 7) 玉川浩司, 飯塚崇史, 小堀真珠子, 新本洋士, 津志田藤二郎, 大麦のプロアントシアニジンのラジカル消去活性及び抗変異原性. 日本食品科学工学会誌, 45 (2), 420-425 (1998)
- 8) Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bowlwell, G. P. and Rice-Evans, C., Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Arch. Biochem. Biophys., 332, 339-346 (1995)
- 9) 沖智之, 竹林純, 山崎光司, 化学反応, 酵素反応を用いた機能性評価, (社) 日本食品科学工学会, 食品機能性評価マニュアル集 第Ⅱ集, pp79-86 (2008)
- 10) 沖智之, 佐藤麻紀, 吉永優, 境哲文, 菅原晃美, 寺原典彦, 須田郁夫, 有色サツマイモの DPPH ラジカル消去能と ORAC (活性酸素吸収能). 日本食品科学工学会誌, 56 (12), 655-659 (2009)
- 11) Singleton, V. L. and Rossi, J. A. Jr., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acids reagent. Am. J. Enol. Vitec., 16, 144-158 (1965)
- 12) Goupy, P., Hungues, M., Boivin, P. and Amiot, M. J., Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extract and of isolated phenolic compounds. J. Sci. Food Agric., 79, 1625-1634 (1999)
- 13) Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y. and Kong, W., Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. Food Chem., 107, 296-304 (2008)
- 14) Qui, Y., Lin, Q. and Beta, T., Antioxidant activity of commercial wild rice and identification of flavonoid compounds in active fraction. J. Agric. Food Chem., 57, 7543-7551 (2009)
- 15) Tian, S., Nakamura, K. and Kayahara, H., Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice and Germinated brown rice. J. Agric. Food Chem., 52, 4808-4813 (2004)