

両連続相マイクロエマルションを
用いた抗酸化物質の評価技術の開発

2015 年 9 月

熊本大学大学院自然科学研究科
藏屋英介

目 次

第 1 章 序論

1-1	抗酸化能の測定における現状と課題	...1
1-2	従来の抗酸化物質の評価法	...1
1-3	両連続相マイクロエマルジョン(BME)	...4
1-4	BME を反応場とする電気化学	...6
1-5	本論文に関する問題提起	...6

第 2 章 BME を用いた親水性ならびに親油性抗酸化物質の電気化学分析

2-1	緒 言	...8
2-2	BME 中でのモデル抗酸化物質の電気化学分析	...9
2-3	実 験	...10
2-3-1	試 薬	...10
2-3-2	電気化学測定のための BME 溶液の調整	...12
2-3-3	装 置	...14
2-3-4	電気化学測定に使用した作用電極とその特徴	...14
2-3-5	BME 中での電気化学測定	...16
2-3-6	Folin-Ciocalteu 法による水相ならびに有機溶媒相中の抗酸化物質濃度の定量	...19
2-4	BME-EC 法によるモデル物質の抗酸化能評価	...20
2-5	BME-EC 法による食品サンプルの抗酸化能評価	...36
2-5-1	試料調整	...36
2-5-2	食品サンプルの抗酸化能評価	...36
2-6	結 語	...41

第3章 BME を用いたオリーブオイルの抗酸化能の評価

3-1	緒言	...42
3-2	実験	...45
3-2-1	試薬	...45
3-2-2	オリーブオイルの脂肪酸組成の測定	...45
3-2-3	オイルならびに抗酸化物質を含む BME 溶液の調整	...47
3-2-4	フェノール化合物の抽出	...48
3-2-5	超臨界クロマトグラフィー (SFC) ならびに LC-MS による抗酸化物質 の定量	...48
3-2-6	LC-MS による Tyrosol 濃度の定量	...48
3-2-7	総ポリフェノール量の定量	...49
3-2-8	ORAC Assay	...49
3-2-9	BME 中での電気化学測定 (BME-EC 法)	...50
3-3	オリーブオイルの脂肪酸組成の解析と抗酸化活性の評価	...53
3-4	BME-EC 法によるオイル中の抗酸化物質の評価	...56
3-5	BME-EC 法によるオリーブオイルの抗酸化能の評価	...64
3-6	結語	...68

第4章 BME を用いた植物精油(エッセンシャルオイル)の抗酸化能の評価

4-1	緒言	...69
4-2	実験	...71
4-2-1	試薬	...71
4-2-2	エッセンシャルオイルのサンプル	...72
4-3	DPPH フリーラジカル捕捉能による植物精油の抗酸化能の評価	...74
4-3-1	溶液の調整ならびに抗酸化活性の測定	...75
4-3-2	DPPH フリーラジカルによる抗酸化能の評価	...77
4-4	BME-EC 法による植物精油の抗酸化能の評価	...80
4-4-1	エッセンシャルオイルを含む BME 溶液の調整	...80

4-4-2	BME 中での電気化学測定	...80
4-4-3	BME-EC 法による抗酸化能の評価	...81
4-5	結 語	...96
第 5 章 瞬間的高圧処理と BME 溶液による直接抽出による抗酸化能の評価		
5-1	緒 言	...97
5-2	水中衝撃波による瞬間的高圧処理	...98
5-3	月桃 (<i>Alpinia zerumbet</i>) の持つ機能性	...100
5-4	HS-GC/MS による香気特性の解析	...101
5-4-1	実験装置	...101
5-4-2	月桃葉の水中衝撃波による瞬間的高圧処理	...102
5-4-3	月桃葉の香気成分の解析	...102
5-4-4	走査型電子顕微鏡 (SEM) による瞬間的高圧処理の評価	...103
5-4-5	月桃葉の香気成分の解析	...105
5-5	瞬間的高圧処理と BME 溶液による直接抽出	...108
5-5-1	実験装置	...108
5-5-2	BME 溶液による月桃葉からの抗酸化物質の直接抽出	...108
5-6	BME 抽出液の BME-EC 法による抗酸化能の評価	...111
5-7	結 語	...116
第 6 章 結 語		...117
参考文献		...121
謝 辞		...133

第1章 序論

1-1 抗酸化能の測定における現状と課題

近年、人々の健康において機能性食品、特に天然の抗酸化物質が注目されている。その中でも、がん予防、老化防止などとの関連が指摘され、活性酸素を消去する抗酸化能には極めて高い注目が集まっている。食品中の主要な抗酸化物質は、ビタミンC (ascorbic acid)、ビタミンE (α -tocopherol)、カロテノイド、フラボノイド、およびフェノール化合物^{1,2}である。さらに、植物から抽出されたフラボノイド、アントシアニン、カテキンなどの生理活性の高いポリフェノールも、代表的な酸抗酸化物質として知られている³⁻⁶。これら機能性成分の含有量評価法の確立は、食品の機能性を評価する上で重要な課題となっている^{7,8}。

これらの物質は、類縁体が多く、配糖体も含めると数百種類あるものもあり、個々の化合物の定性・定量分析は困難を極めることが多い。そのため、個々の抗酸化物質を定性・定量分析することよりも、総量としての抗酸化能の評価を行う手法が一般的に用いられている。本研究では、両連続相マイクロエマルジョン (BME) を用いた電気化学測定に基づく新規な抗酸化能の直接評価法を提案し、その有用性を明らかにする。

この章では、抗酸化能の測定における現状と課題をまとめるとともに、本論文に関する研究開始時における食品類の抗酸化能評価に関する問題提起について述べる。さらに両連続相マイクロエマルジョンを用いた電気化学測定の研究のあゆみと本研究への関連についても説明する。

1-2 従来の抗酸化物質の評価法

食品の抗酸化能を厳密に測定する方法は、これまで様々な提案がなされている^{7,9-12}。特に抗酸化能を迅速かつ簡単に定量できる便利な方法が求められている。抗酸化能を決定する最も一般的な方法は、2つの主なグループに分けられる。1つは、酸化剤の還元による色の変化を通して測定を行う単電子移動反応に基づく試験方法と抗酸化

物質と基質（Probe）とのフリーラジカルに対する競合反応に基づく水素原子移動反応に基づく試験方法がある。

電子移動反応に基づく試験方法には、TEAC法 (Trolox equivalent antioxidant capacity assay)、FRAP法 (ferric reducing ability of plasma assay)、CUPRAC法 (copper reduction assay)、DPPH法 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay)などがある。TEAC法は、水溶性、脂溶性のどちらのサンプルも測定可能で総抗酸化力を測定するのに適した方法であるが、ラジカルの発生源としてヒトの生体に存在しない 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6 sulphonic acid (ABTS) 試薬を用いる点に留意する必要がある。FRAP法は、血清や植物の抗酸化能分析に適しているが、チオール基 (-SH) を有する化合物（グルタチオン、タンパク質）の測定に不向きであるとされている。DPPH法は、測定方法自体、非常に簡便であるが、一部の抗酸化物質は DPPH と反応せず、またDPPHはヒトの生体内に存在しないラジカルであることに留意が必要である。

水素原子移動反応に基づく試験方法には、CBA 法 (crocin bleaching assay)、TRAP 法 (total peroxyl radical-trapping antioxidant parameter assay)、ORAC 法 (oxygen radical absorbance capacity assay)がある。TRAP 法は、ペルオキシラジカルに対するトラッピング活性 (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter: TRAP) を指標とした抗酸化測定法で、ABAP 試薬 (2,2'-azobis(2-amidinopropane)) より生成した炭素ラジカル ($R\cdot$) は、酸素と反応させるとペルオキシラジカル ($ROO\cdot$) を形成し、さらにルミノール (LH) と反応させることで 425nm を中心とする化学発光を呈する。サンプル中に含まれる抗酸化物質は、ペルオキシラジカルをトラップするため 抗酸化物質の量に応じて、化学発光の立ち上がりに遅延が生じ、この化学発光の遅延の大小によって、ペルオキシラジカル消去活性を算出する方法である。ORAC 法は、水溶性、脂溶性のどちらのサンプルも測定できる一方で、 β -カロテンや不飽和脂肪酸はその反応の機構が異なるため測定できない。アメリカ農務省 (USDA)は、各食品のもつ抗酸化性の標準指標としてこの指標を用いていたが、最近になって、特定の抗酸化物の ORAC 値がヒトの健康と直接関連しないこと、他の方法で求めた抗酸化活性と相関しないこと、抗酸化物の効能がラジカルの捕捉だけとは限らないこと、食品およびサプリメント

トの評価や使用に際して誤解のもとになっていることを理由に ORAC データベースを撤回した¹³。

その他にも、2つのグループを応用した TOSC 法 (total oxidant scavenging capacity assay)、ケミルミネッセンス法、電気化学ルミネッセンス法や、電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance, ESR)によるラジカル消去能の測定法などもある^{14,15}。ESR 法では、一定量のラジカルが生成できる溶液に抗酸化物質を含む試料を加え、発生するラジカル量が減少すれば、抗酸化性があると評価できる。一定量のラジカルが生成できる溶液には、活性酸素種を発生させる物質（たとえば過酸化水素）と、活性酸素種を安定で長寿命のラジカルに変換するためのスピントラップ剤を含んだ溶液を用いる。また、ESR 法は活性酸素を発生させる物質を選択することによって、特定の活性酸素種を生成させて測定できること、実際の生体内での反応系に近いことなどの理由により期待されている測定法の一つである。

食品中には、多くの抗酸化物質が存在するだけでなく、配糖体も含めると数百種類の類縁体を持つものまであり、個々の化合物の分析は困難を極める。そのため、フェノール試薬との還元反応による着色で評価する方法 (Folin-Ciocalteu 法)¹⁶をはじめ、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) フリーラジカル消去能の測定^{17,18}、2,2'-azobis (2-amidino propane) dihydrochloride (AAPH) 脂質ペルオキシラジカル捕捉能の測定 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)^{10,19}あるいは過酸化水素の分解過程において生成するヒドロキシラジカル捕捉能を測定 (HORAC) する方法²⁰など、総量的な抗酸化能を評価する手法が開発され用いられている。しかしながら、いずれの方法も標準物質の抗酸化能に換算して還元性物質を一元的に測定しているため、弊害も多い。例えば、野菜や果実に含有する代表的な水溶性還元物質であるアスコルビン酸は、Folin-Ciocalteu 法によって容易に発色しポリフェノール類の抗酸化能に大きな正の誤差を与える。またこれらの方法は、有機溶媒への抽出プロセスを含むため、対象となるポリフェノール類の溶媒への溶解度がその結果に大きく影響する。DPPH フリーラジカル消去能については、DPPH そのものが難溶性物質であり、溶解する溶媒も限定的であるほか、pH 依存性や溶媒に含有する水分量によってもその反応性は大きく変わる。DPPH フリーラジカルとの反応は抗酸化物質によって反応速度が異なり、反応

しない（反応速度が非常に遅い）物質がある一方、共存溶媒や植物色素を構成する錯体の金属イオンの酸化還元の影響を大きく受けるなど様々な問題点が指摘されている²¹⁻²³。ORAC 法においても反応温度の精度や使用する溶媒の影響、抗酸化物質の濃度などによってその値は大きく異なってしまうため、精度管理のための詳細なバリデーション方法等も提案されている²⁴。このような背景のなか、電気化学分析法による抗酸化能の評価も試みられている。電気化学反応は、電極表面において抗酸化物質との酸化還元反応をダイレクトに測定することができ、コーヒーやお茶などの飲料²⁵やワイン中のポリフェノールの測定²⁶⁻²⁸など試みられている。電気化学分析法は、酸化還元に伴う電流値や電気量を測定することにより化学分析と同様な抗酸化能の評価を行うことができるが、電解質溶液中での反応であるため、化学分析同様、親油性化合物の抗酸化能の評価は容易ではなく、特に食用オイルやエッセンシャルオイルに含まれる親油性の抗酸化物質の定量は、従来法では抽出プロセスの最適化や抽出効率による再現性の問題など、多くの課題を有している。また、抗酸化能の決定は、総抗酸化活性がフェノール化合物を含む様々な抗酸化物質の組み合わせた活性のため、多様な抗酸化物質の構成や総合的な濃度など考慮する必要がある。

本論文では、これらの問題を解決するために、両連続相マイクロエマルジョン (Bicontinuous Microemulsion, BME) を反応場として、代表的な抗酸化物質について電気化学的な分析を試みた。水と油がミクロスケールで両連続的に共存した BME 溶液は熱力学的安定系であり、親油性化合物と親水性化合物の両者を同時に溶解し、電気化学測定が可能である。本論文では、これらの技術を応用し BME 中で親水性と親油性物質の抗酸化能を電気化学的な手法を用いて評価可能か検討を行った。

1-3 両連続相マイクロエマルジョン(BME)

両連続相マイクロエマルジョン(BME)は、非常に興味深い liquid-liquid 界面構造を持つ。マイクロエマルジョン (microemulsion, ME) は熱力学的に安定な水/界面活性剤/油から成る分散系であり、通常のエマルジョンのように急激な攪拌などを必要とせず容易に形成する。また、溶液系が一度平衡に達すると時間経過によって相変化することはないとされる。ME は水、油などの本来混じり合わない 2 相の液体及び 1 種類

以上の界面活性剤または界面活性剤-中級アルコールなどの補助界面活性剤の混合物で構成される。また、溶液系の界面活性剤の親水性—親油性バランス (hydrophilic-lipophilic balance, HLB) を補助界面活性剤の添加、温度、塩濃度などの界面活性剤溶液の条件を調節することで ME の動的な溶液構造が変化する²⁹。

水/界面活性剤/油系からなる溶液を密封し、十分に攪拌してから一定温度に保っておくと、過剰相(水相や油相)を伴った ME 相が形成される。塩濃度や補助界面活性剤濃度の調節により、界面活性剤の HLB を制御することで、ME 相は下相、中間相、上相へ(比重：水相>油相の場合)と移行し、Winsor 型の相挙動 (Winsor I · Winsor III · Winsor II)を示す。HLB が親水性>親油性であるとき水中に油滴を可溶化したミセルが形成され、oil in water マイクロエマルジョン(O/W ME)または Winsor I と呼ばれる。また、HLB が親水性<親油性であるとき油中に水滴を可溶化した逆ミセルが形成され、water in oil マイクロエマルジョン(W/O ME)または Winsor II と呼ばれる。一方で系の HLB が親水性＝親油性である場合、水相と油相の間に界面活性剤が局在した相が形成される。その相は水相と油相がミクロかつ連続的に存在しており、BME または Winsor III と呼ばれる。一般にイオン性界面活性剤の場合は、温度変化による転相は起こりにくく、むしろアルコールや塩の濃度、油と水の比率により転相が起こる事が知られている。一方でノニオン性界面活性剤の場合は温度依存性が高く、低温で乳化すれば O/W 型エマルジョンが生成し、高温で乳化すれば、W/O 型エマルジョンが生成する。これはノニオン性界面活性剤の多くの親水基はポリエーテル鎖で形成されており、親水性はポリエーテル鎖と水の水素結合に由来しているためである。

Guégring らは NaCl aq. /SDS (Sodium dodecyl sulfate) + butanol/toluene 系において NaCl 濃度を調節することにより BME が形成されることを spin-echo NMR 測定によって確認している³⁰。NaCl 濃度を変化させながら水、butanol、SDS、toluene の自己拡散係数を測定すると SDS は NaCl 濃度に対し山型の自己拡散係数を示した。つまり、NaCl が中濃度領域で最も自己拡散係数が高かった。この領域では他の成分も均一系に対し比較的高い自己拡散係数を保持しており、全ての分子が自由に動き回っていることから、水/toluene が混在している BME 相の特徴を示している。

1-4 BME を反応場とする電気化学

BME は親水的な化学物質と親油的な化学物質が共存することから、特徴的な電気化学的反応場としても使用可能である³¹⁻³³。spin-echo NMR により測定した BME 中の水と油の自己拡散係数は、それぞれ単独相に匹敵するほど高い値であることが確認されている³⁰。NaCl aq./SDS+2-butanol/toluene 系 BME 溶液において、ミクロ水相中の Fe(CN)₆ イオンおよびミクロ油相の Ferrocene の可逆的な酸化還元応答が観察された^{32,33}。電気化学測定に使用する作用電極表面の HLB によって、BME 溶液と電極表面の液/液/固界面が変化する。そのため、親水的な Indium Thin Oxide (ITO) 電極ではミクロ水相の酸化還元物質の電気化学的応答が確認され、逆に親油的な Pyrolytic Graphite Basal Plane (PGB) 電極または Highly Oriented Pyrolytic Graphite (HOPG) 電極ではミクロ油相に存在する酸化還元物質の電気化学的応答が得られる。両親媒的な Au disk 電極や Glassy Carbon (GC) 電極ではミクロ水相とミクロ油相の両方に存在する酸化還元応答が得られることが分かっている。

1-5 本論文に関する問題提起

食品の機能性への関心が一層高まる中で、食品の持つ機能性の評価方法は益々重要となっている。抗酸化物質は、生物化学あるいは栄養学において、狭義には脂質の過酸化反応の抑制、広義には生体の酸化ストレスあるいは食品の変質の原因となる活性酸素種（酸素フリーラジカル、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素等）を捕捉する無害化反応に寄与するとされる。さらに抗酸化物質は、生体内においても酵素による過酸化物質の代謝過程において重要な役割を担うなど、単なる食品の機能性評価にとどまらず、新たな化学物質や天然の抗酸化物質の機能性評価として重要な位置付けにある。しかしながら、抗酸化能の決定は、総抗酸化活性がフェノール化合物を含む親水性／両親媒性／親油性といった様々な抗酸化物質の組み合わせによる活性であり、多様な抗酸化物質の構成や総合的な濃度など単一の方法で評価することは困難とされている。そのため、これまで抗酸化能の様々な評価方法が提案されているが、依然として迅速かつ簡単に定量できる便利な方法が求められている。

本論文では、熱力学的安定系である BME の親油性化合物と親水性化合物の両者を同時に溶解し、さらに同じ溶液から親水性化合物と親油性化合物の酸化還元応答を個別に得られる特徴を最大限活用し、新たな抗酸化能の評価技術の開発を目的とした。従来法での抽出プロセスの煩雑さや抽出効率、抗酸化能評価における再現性の問題を改善するとともに、BME 中で親水性／両親媒性／親油性物質の抗酸化能を電気化学的な手法を用いて簡便に評価する方法を検討した。

第 2 章では、抗酸化物質を評価する特異的な反応場として BME に注目し、親油性の高い化合物と親水性の高い化合物の両者を同時に溶解した溶液中で、電気化学的な手法（BME-EC 法）によりそれぞれの酸化還元力を分離して測定することを試みた。

第 3 章では代表的な機能性食用油であるオリーブオイルを溶解した BME 溶液中で電気化学測定することによって、オイル中の α -tocopherol やポリフェノールのような抗酸化物質の定量分析を検討した。親油性／疎水性電極であるフッ素化したナノカーボンフィルム電極（F-ECR）を使用することで、オリーブオイル中の親油性の抗酸化物質を直接、測定する方法を検討した。

第 4 章では、植物精油（エッセンシャルオイル）の新たな抗酸化能評価法として BME-EC 法の検討を行った。植物精油の機能性探索には、DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) フリーラジカルによる抗酸化能の測定（DPPH 法）が一般に行われているが、カイネティックな反応であるために、反応時間はもとより酸化体／還元体比、溶媒の種類、含水量や pH、遷移金属イオンの影響など受けやすく、測定条件や測定者によるばらつきの問題が指摘されている。本章では、一般に市販されているエッセンシャルオイルについて BME-EC 法により抗酸化能の評価を行った。

第 5 章では、水中衝撃波により発生する瞬間的高圧によって、化学的ダメージを与えずに植物の細胞や組織に破壊しつつ、BME を抽出溶媒とすることで、固体からの高効率直接抽出を試み、抗酸化能評価の前処理技術としての可能性について検討を行った。

第 6 章では、これらの結果を総括するとともに、BME 溶液を反応場とした抗酸化活性の評価に関する展望ならびに BME 溶液の抽出溶媒としての可能性について総合的に論じた。

第2章 BME を用いた親水性ならびに親油性抗酸化物質の電気化学分析

2-1 緒 言

近年、人々の健康において機能性食品およびそれらの役割が注目されている。多くの生化学的な研究により、抗酸化物質が、酸化連鎖反応の開始あるいは伝播を中断し、他の分子の酸化を抑制あるいは遅延することが示されている¹。これらの有益な作用は、抗酸化活性を有する生物学の化合物に部分的にあるとされていた。食品の主要な抗酸化物質は、ビタミンC、ビタミンE、カロテノイド、フラボノイド、およびフェノール化合物である²。植物から抽出されたフラボノイド、アントシアニン、カテキンなどのポリフェノールも、代表的な抗酸化物質である。

食品に含まれる生理活性を示すポリフェノールの分析は、その機能性を示す上で極めて重要である。フェノール性水酸基の還元力に基づきフェノール試薬を使用するFolin-Ciocalteu法は、最も代表的な分析方法の一つである¹⁶。Folin-Ciocalte法は、それらの還元力を没食子酸の還元力と比較して、化合物の抗酸化活性を評価するために使用される。その他の代表的な方法として、DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)法¹⁷、ORAC (oxygen radical absorbance capacity)法、およびTEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity; Trolox; 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)法などがある^{7,8}。 α -トコフェロール(α -tocopherol)などの脂溶性の抗酸化物質の評価方法には、アセトン希釈溶媒としてペルオキシラジカルの消去反応に基づくORAC方法などがある。

さらに、抗酸化活性は、その抽出過程において使用される溶媒により大きく影響されることも明らかとなっている¹⁰。それゆえ、食品中の抗酸化物質、特に脂溶性の高い抗酸化物質の定性、定量的に求められる簡単かつ同時分析技術が望まれている³⁴⁻³⁶。このような背景のなか、電気化学分析法による抗酸化能の評価も試みられており、食品中や生物学的なサンプル中の抗酸化物質について、水溶液系やisopropanol³⁷、ethanol³⁸などの有機溶媒中での電気化学的な分析法^{25-27,36-39}も研究されている。電気化学反応は、電極表面において抗酸化物質との酸化還元反応をダイレクトに測定することができ、コーヒーやお茶などの飲料やワイン中のポリフェノールの測定など試み

られている。電気化学分析法は、酸化還元に伴う電流値や電気量を測定することにより化学分析と同様な抗酸化能の評価を行うことができるが、電解質溶液中での反応であるため、化学分析同様、親油性化合物の抗酸化能の評価は容易ではない。

本研究では、界面活性剤により親油性と親水性の溶媒が熱力学的に安定となる両連続相マイクロエマルジョン (Bicontinuous Microemulsion, BME) を反応場とし、代表的な抗酸化物質について電気化学的な分析を試みた。

2-2 BME 中でのモデル抗酸化物質の電気化学分析

水と油がミクروسケールで両連続的に共存した BME 溶液は熱力学的安定系であり、親油性、両親媒性ならびに親水性化合物を同時に溶解し、電気化学測定が可能である。BME 中での電気化学的な反応の解析、合成に関連する研究は、1990 年代に Rusling らによって精力的に進められている⁴⁰。また、國武らの先行研究により、BME 中で親油性化合物ならびに親水性化合物の酸化還元力を個別に測定できることを明らかにした。特に、電極表面の親水性や親油性の高い電極を用いることで solid / liquid / liquid 界面におけるマイクロエマルジョンの構造をダイナミックに変化させ、BME 中において同じ溶液から親水性化合物と親油性化合物の酸化還元応答を個別に測定することが可能であることを報告している³¹⁻³³。Figure 2-1 に示すように、BME 中におけるミクロ水相とミクロ油相への電気化学的なコンタクトは、電極表面の親水性や親油性を制御することで交互にあるいは同時にもたらすことができる。したがって、同じ BME 中において親水性、親油性、両親媒性化合物のそれぞれ個々の抗酸化活性を個別に測定することが可能となる。本研究では、これらの技術を応用し BME 中で親水性と親油性物質の抗酸化能を個別に電気化学的に定量分析を行えるか検討を行った。

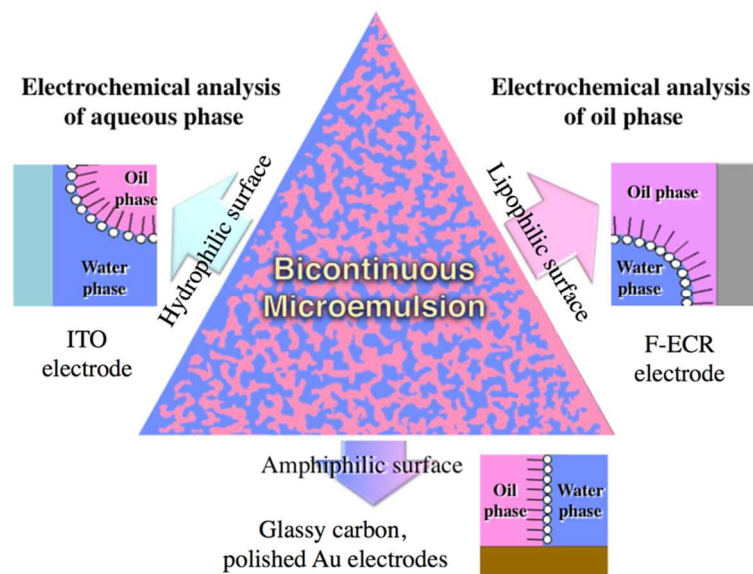


Figure 2-1. Schematic representation of electrochemical analysis in a bicontinuous microemulsion

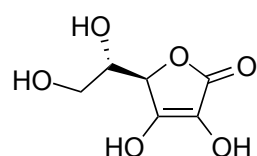
2-3 実験

2-3-1 試薬

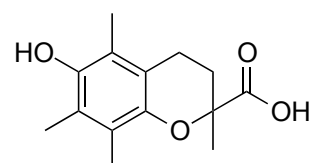
本章で使用した試薬を Table 2-1 に示した。試薬は、いずれも特級以上のグレードを使用し、溶液の調整には全て超純水を使用した。本章では、抗酸化モデル物質として、親水性抗酸化物質にはアスコルビン酸 (ascorbic acid) および没食子酸 (gallic acid) を、両親媒性抗酸化物質には Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) を、親油性抗酸化物質には α -トコフェロール (α -tocopherol) を用いた。それぞれの抗酸化物質の構造式を Figure 2-2 に示す。

Table 2-1 Materials

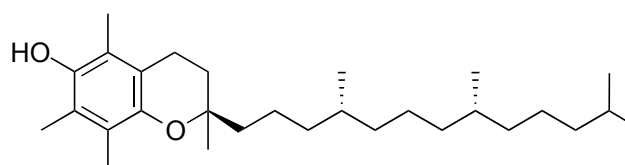
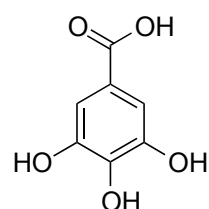
Materials	Product source
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Nacalai Tesque Co.
2-Butanol	Nacalai Tesque Co.
Sodium chloride (NaCl)	Wako
Toluene	Nacalai Tesque Co.
Gallic acid	Nacalai Tesque Co.
Ascorbic acid	Merck Japan Co.
Trolox	TCI Co.
(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)	
α -Tocopherol	Nacalai Tesque Co.
Sodium carbonate	Nacalai Tesque Co.
Phenol Reagent	Nacalai Tesque Co.



Ascorbic acid



Trolox

 α -Tocopherol

Gallic acid

Figure 2-2. モデル抗酸化物質の構造式

2-3-2 電気化学測定のための BME 溶液の調整

本章における電気化学測定は、toluene / SDS+2-butanol / saline 系の BME を使用し、サイクリックボルタンメトリー (cyclic voltammetry, CV) により、モデル抗酸化物質の定性・定量分析を行った。BME 溶液は、1.0M NaCl + 50mM リン酸緩衝液(pH=7.0, イオン強度: $\mu=0.1$)、界面活性剤として SDS、補助界面活性剤として 2-butanol、toluene から構成されており、抗酸化物質を含む BME 溶液の調整は、Table 2-2 に示す組成により行った。抗酸化物質の溶媒への溶解度に限界があるため溶解する溶媒により、2 種類の BME 溶液を調整し最終的に同じ体積となるように調整した。モデル抗酸化物質については、代表的なポリフェノール化合物として Folin-Ciocalteu 法で標準物質として使用されている gallic acid、両親媒性化合物として Trolox、親油性抗酸化物質として α -tocopherol (vitamin E) を選んだ。親水性、両親媒性、親油性化合物は、すべて BME 溶液に溶解した。親水性抗酸化物質 (ascorbic acid ならびに gallic acid) は 50 mM の水溶液を、両親媒性ならびに親油性抗酸化物質 (Trolox ならびに α -tocopherol) は、50 mM の 2-butanol 溶液としてあらかじめ調整した。調整した BME は 2 時間以上、室温 (約 25 °C) で静置、安定化させた。抗酸化物質は、あらかじめ調整した 50 mM 溶液 100 μ L を BME に加え測定溶液とした。これらの抗酸化物質の濃度は、BME の水相または有機溶媒相の見かけの濃度と定義し、その濃度は 1 mM となる。

Table 2-2. Constituents of the BME sample solutions.

Water phase	Oil phase	Surfactant	Co-Surfactant	Antioxidant	
1.0 M NaCl and 50 mM phosphate buffer ^a (mL)	Toluene (mL)	SDS (g)	2-Butanol (mL)	50 mM antioxidant (ascorbic acid or gallic acid) aq. (mL)	50 mM antioxidant (Trolox or α -tocopherol) 2-butanol solution (mL)
4.90	5.00	0.45	1.20	0.10	-
5.00	5.00	0.45	1.10	-	0.10

^a pH = 7.0

According to the recipe in Table 2-2, the volume ratio between macro saline, BME and macro oil phases are roughly 1:2:1. The individual antioxidant concentration was 1 mM in the macro or toluene phase in the sample BME solution.

2-3-3 装 置

本章で使用した装置、電極、研磨剤を Table 2-3 に示す。

2-3-4 電気化学測定に使用した作用電極とその特徴

BME は、水と油がミクロスケールで両連続的に共存した熱力学的に安定な系であり、親油性、両親媒性ならびに親水性化合物を同時に溶解し、電気化学測定が可能である。特に、電極表面の親水性や親油性の高い電極を用いることで solid / liquid / liquid 界面におけるマイクロエマルジョンの構造をダイナミックに変化させ、BME 中において同じ溶液から親水性化合物と親油性化合物の酸化還元応答を個別に測定することが可能である。BME 中での電気化学的な応答に関して、電極表面の特性がどのように影響するか、表面の親/疎水性・親/疎油性が異なる作用電極 (working electrode, W.E.) を用いて検討した。ここでは、使用した電極の性質と電極の洗浄方法を以下に示す。

(1) Indium Tin Oxide (ITO) 電極

ITO 電極は、酸化インジウムに数%程度の酸化スズを混ぜたものである。透明で導電性を持つことから、主にガラス基板上に薄膜を形成させ、透明電極として液晶ディスプレイ等に利用されている。電気化学測定においても親水性の高い電極として使用され³¹⁻³³、本研究でも、親水性電極として ITO 電極を使用した。ITO 電極をおおよそ 1cm² にカットし、acetone、アニオン界面活性剤、methanol、純水で超音波洗浄を行った。洗浄後の代表的な水の接触角は 16.5°であった。

(2) F-ECR 電極

F-ECR は電子サイクロトロンスパッタ法 (electron cyclotron resonance, ECR)により作製されたナノカーボンフィルム電極であり、sp²/sp³ 結合がハイブリットされたカーボン薄膜を CF₄ でわずかにフッ素化してある。F-ECR の特性には以下のようなものがある⁴¹⁻⁴⁷。

- ・広い電位窓を持つ。 (-1.6 ～ +2.5 vs. Ag/AgCl)
- ・高い電気化学安定性と低い電気二重層容量を持つ。
- ・非常にフラットな表面を持ち、汚れにくい。
- ・オリゴヌクレオチドのような生体関連物質への適応性が優れている。

電気化学測定にあたり、使用毎に 2-butanol で洗浄したのち入念に toluene で洗浄した。洗浄後の代表的な水の接触角は 86.8°であった。

(3) Au 電極

両親媒性電極として Au 電極 (BAS Co. Ltd.)を用いた。Au 電極は、直径 1.6mm ϕ のディスク電極を使用し、測定毎につきの手順により研磨、洗浄して使用した。まず 1 μm ダイヤモンド研磨剤とダイヤモンド研磨用パットを使用して電極表面を大まかに研磨し、超純粋水で研磨剤を洗い流した。その後 0.05 μm アルミナ研磨材とアルミナ研磨用パットを使用して仕上げを行い、超純水で洗浄したのち電気化学測定に供した。

(4) グラッシーカーボン (GC) 電極

もう一つの両親媒電極として GC 電極を用いた。炭素材料に分類されるグラッシーカーボン材料は大変ユニークな構造をしており、ベーサルプレーンとエッジプレーンとがランダムな状態になっていることが知られている。エッジ面が電気化学的な反応性に富む部位となり、溶液等の浸潤はない。分析化学領域で電気化学計測の電極、高速液体クロマトグラフィーの検出用電極、バイオセンサー等に利用できる優れた材料であり、これまでも抗酸化物質の電気化学測定にも広く用いられている^{25-27,40}。

電極の洗浄は、エメリーペーパー (#4000) 上に純水を滴下し、研磨を行った。その後、超純水で電極表面を洗浄したのち電気化学測定に供した。

(5) Highly Oriented Pyrolytic Graphite (HOPG) 電極

疎水的、親油的な電極として HOPG 電極を用いた。HOPG は Highly Oriented Pyrolytic Graphite の略であり、高度に配向したパイログラファイトのことである。測定前に毎回セロハンテープで剥離し、新たな表面を露出させて測定を行った。

2-3-5 電気化学測定に使用した作用電極とその特徴

電気化学測定は、それぞれのモデル抗酸化物質を BME に溶解し、作用極として親水性の ITO 電極ならびに Au 電極、親油性の HOPG 電極ならびに F-ECR 電極を用いた。電気化学測定は、電気化学測定装置（ポテンショスタット）を使用し、サイクリックボルタンメトリー (cyclic voltammetry, CV) により、モデル抗酸化物質の定性、定量分析を行った。Pt 線（対極）、参照電極 (reference electrode, R.E.) として飽和カルメル電極 (SCE) を含めた 3 電極を BME 溶液に浸して測定を行った (Figure 2-3)。また、CV の繰り返し測定による電極表面の汚染を防ぐため、実験は全て First Scan で行った。温度は 25 °C (室温) で測定を行った。また、特に脱気は行わず測定を行った。電極面積は、内径 5mm ϕ の O-リングにより規制し、幾何学的な面積を電極面積とした。

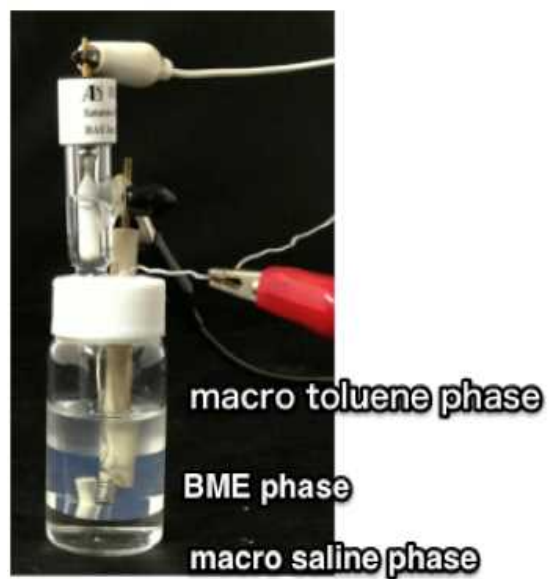


Figure 2-3. Typical set up for electrochemistry in the BME with conventional three electrodes.

Table 2-3. 本章で使用した装置・器具

装 置	規 格	製造元
F-ECR (Fluorinated Nanocarbon Film) 電極		産業技術総合研究所
GC (Glassy Carbon) 電極	OD : 6 mm ID : 3 mm	BAS(株)
エメリーペーパー #4000		BAS(株)
Au 電極	OD : 6 mm ID : 3 mm	BAS(株)
0.05 μ m 研磨用アルミナ		BAS(株)
アルミナ用研磨パット		BAS(株)
1 μ m 研磨用ダイヤモンド		BAS(株)
ダイヤモンド用研磨パット		BAS(株)
HOPG (Highly Oriented Pyrolytic Graphite) 電極		巴工業 (株)
ITO (Indium Tin Oxide) 電極		Kuramoto Co.
ニュービスタ		A・I・C(株)
Pt wire	0.25 mm ϕ	田中貴金属(株)
SCE (Standard Calomel Electrode)		BAS(株)
ALS モデル 814B デュアル電気化学アナライザー		BAS(株)
マイクロプレートリーダー Varioskan Flash Multimode Reader		Thermo Fisher Scientific Inc.

2-3-6 Folin-Ciocalteu 法¹⁶による水相ならびに有機溶媒相中の抗酸化物質濃度の定量

植物界に広く分布していて複数のフェノール性水酸基を有する物質群であるポリフェノール類の総量の測定法として一般的に用いられているものに Folin-Ciocalteu 法と Folin-Denis 法とがある。いずれも Folin 試薬（フェノール試薬）を用いる吸光光度法で、Folin-Ciocalteu 法は、茶葉や茶飲料のポリフェノール総量の分析法として ISO の公定法（ISO14502-1:2005）に、Folin-Denis 法は、ワインや蒸留酒の「タンニン」分析法として AOAC International(AOAC Method 952.03,955.25)に採用されている。ここでは、BME における親水性、両親媒性抗酸化物質の水相ならびに有機溶媒相へのそれぞれの分配を明らかにするために、Folin-Ciocalteu 法により水相ならびに有機溶媒相中の抗酸化物質濃度を定量した。

（１）前処理

水相に分配している抗酸化物質の測定は、BME を作製後、抗酸化物質を所定量添加し、室温（約 25 °C）で 2 時間、静置して安定化させたのち、水相を取り出してそのまま試料とした。有機溶媒相中の抗酸化物質は、同様に BME を調整したのち、96 well のガラス製マイクロプレートにならびに有機溶媒相を 20 μ L 取り出し、真空デシケーター中にて溶媒である toluene を蒸発乾固した。その後、純水を 20 μ L 加えて再溶解し測定試料とした。

（２）Folin-Ciocalteu 法による定量

96 well マイクロプレートに試験液 20 μ L それぞれ取り、これにフェノール試薬 10 μ L、加えてよく混合した。続いて 10 %炭酸ナトリウム溶液 40 μ L を加え、さらに水 130 μ L を加えてよく混合し、十分に発色させたあと、725 nm の吸光度を測定した。標準溶液には、100 μ g/mL 没食子酸ならびに Trolox 標準溶液から、5、10、20、50 μ g/mL の溶液をそれぞれ調整し、同様に操作して得た検量線から各相中に含まれる没食子酸ならびに Trolox の濃度を求めた。

2-4 BME-EC 法によるモデル物質の抗酸化能評価

Figure 2-4 に BME 中において ITO 電極 (A) ならびに F-ECR 電極 (B) により測定した gallic acid, ascorbic acid, Trolox ならびに α -tocopherol の CV を示す。ITO 電極を使用することにより、gallic acid, ascorbic acid ならびに Trolox の不可逆的な酸化ピークが 0.61, 0.41 ならびに 0.72 V にそれぞれ観察された (Figure 2-4A)。それとは対照的に、ITO 電極では、 α -tocopherol の酸化ピークは観察されなかった。このことは、親水性の高い ITO 電極界面が、 α -tocopherol が溶解しているミクロ油相にコンタクトできていないことを示唆している。

Figure 2-4B に、親油的かつ疎水的な F-ECR 電極による同じ BME 溶液での CV を示す。F-ECR 電極を使用することにより、両親媒的 Trolox と親油的な α -tocopherol の不可逆的な酸化ピークが 0.90 ならびに 0.69 V にそれぞれ観察された。

親水性の gallic acid ならびに ascorbic acid の電気化学的な応答は、まったく見られなかったことから、F-ECR 電極では、ミクロならびにマクロ toluene 相中において gallic acid ならびに ascorbic acid は検出されない (< 0.02 mM) ことが明らかとなった。両親媒性の抗酸化物質である Trolox は、水相ならびに油相間での分配により両方の相に分配しているため ITO 電極と F-ECR 電極の両方で観測された。Table 2-4 に Folin-Ciocalteu 法により三相マイクロエマルジョン中におけるマクロ水相と toluene 相への gallic acid ならびに Trolox の分配を求めた結果を示す。gallic acid は、その大部分がマクロ水相に分配しており、マクロ toluene 相には検出されなかった。Trolox のマクロ水相とマクロ toluene 相への分配を評価したところ、初期濃度 1 mM に対しそれぞれ 0.60 ならびに 0.16 mM であった。実際のところマクロ水相とマクロ toluene 相の合計濃度が 1 mM 以下であったことから、BME 溶液中の界面活性剤層に一部が濃縮されていることが示唆された。

Trolox のマクロ水相への分配は、マクロ toluene 相の 3.75 倍であったにもかかわらず、BME 中における F-ECR 電極での酸化ピークは、1.6 倍高い値にとどまった。このことは、F-ECR 電極はミクロ toluene 相にコンタクトしているだけ

でなく、液-液界面における局所的な界面活性剤にもコンタクトしていることが考えられる。

また、Figure 2-4C, Figure 2-4D ならびに Figure 2-5 に示すように、すべての測定系において観測された酸化ピークは、掃引速度のルートに比例し、モデル抗酸化物質の酸化反応は、シンプルな拡散律速に従っていることが明らかとなった。

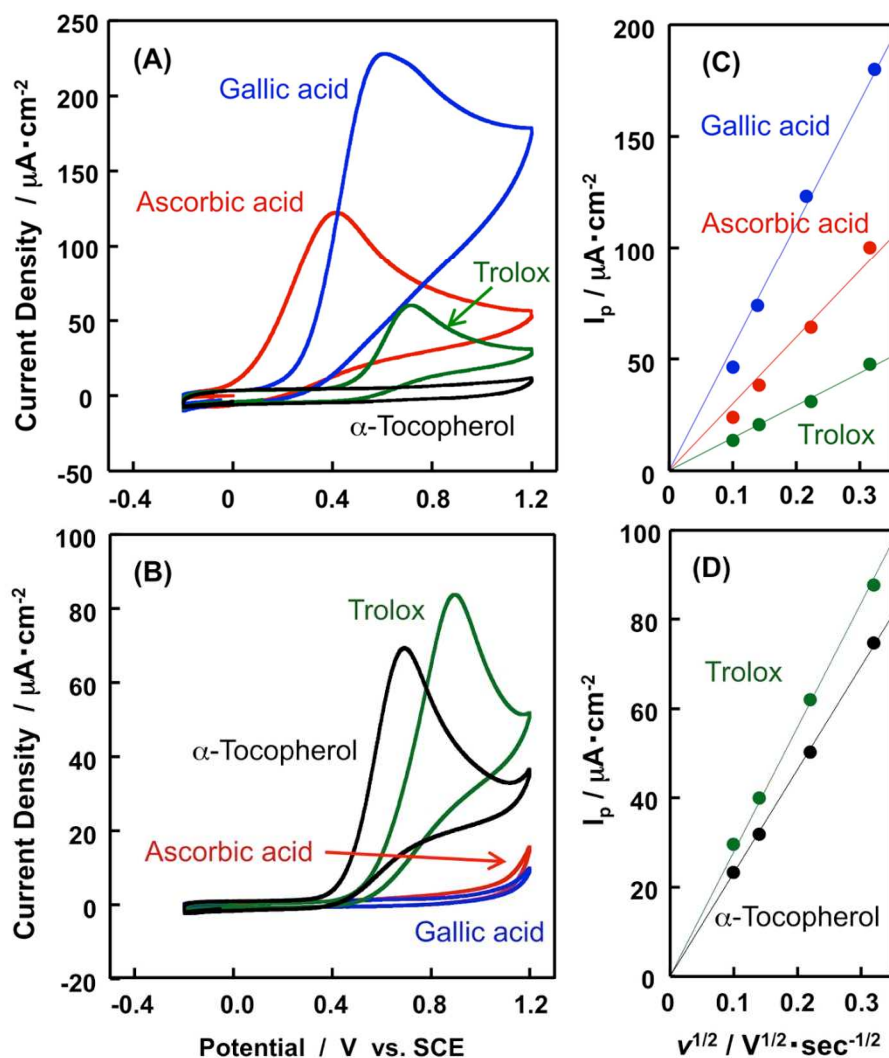


Figure 2-4. CVs (A and B) at 0.1 V/sec and plots of peak currents against square root of scan rates (C and D) of BME solutions in the presence of 1 mM gallic acid, ascorbic acid, Trolox or α -tocopherol measured using an ITO electrode (A and C), and an F-ECR electrode (B and D).

Table 2-4. Concentrations of gallic acid and Trolox in macro saline and macro toluene phases with measured by Folin–Ciocalteu method. Three macro phased microemulsions were prepared with 1 mM gallic acid or 1mM Trolox.

	Measured Concentrations (mM)	
	gallic acid	Trolox
Macro saline phase	0.98	0.60
Macro toluene phase	N.D.	0.16
N.D. (Not Detected) : < 0.02 mM		

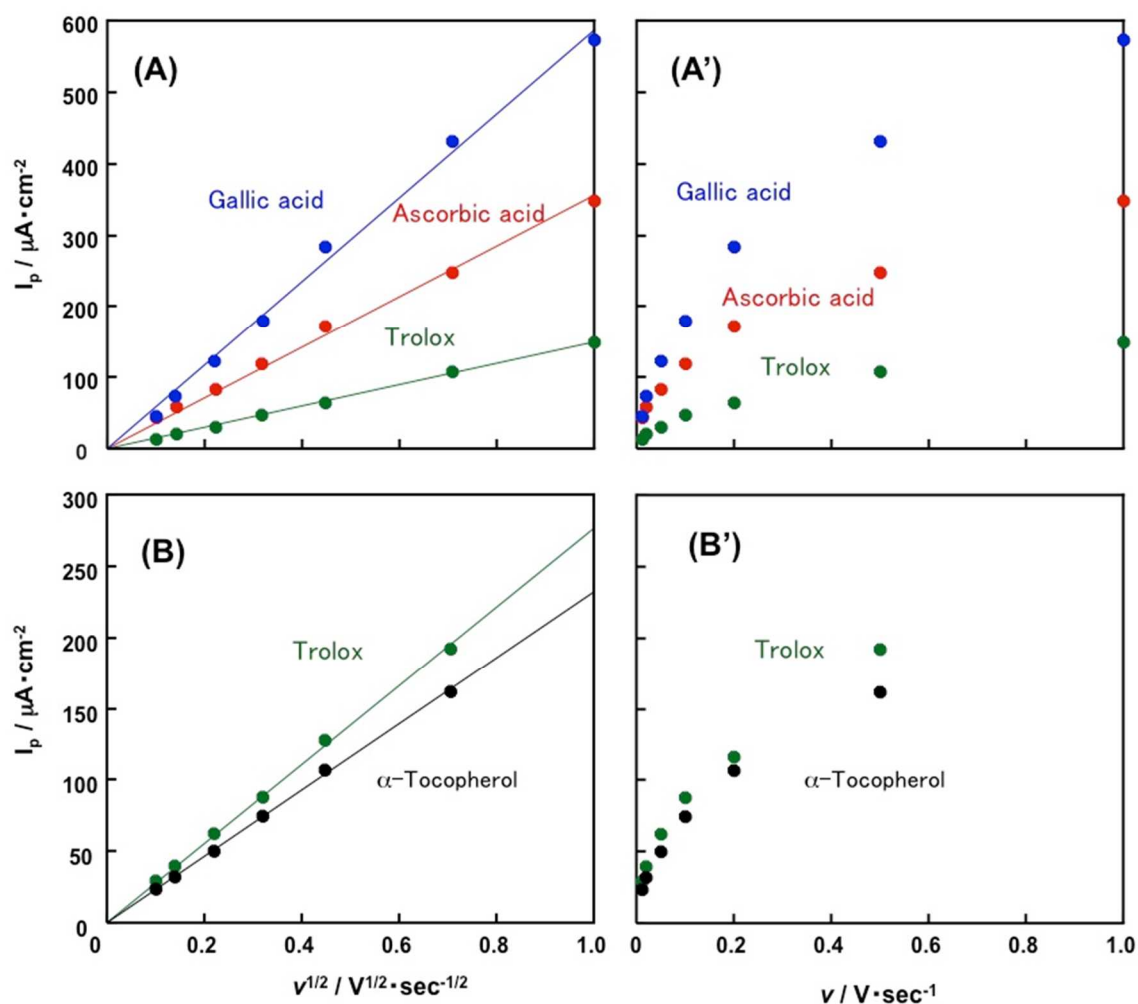


Figure 2-5. Plots of peak currents against square root of scan rates (A and B) and scan rates (A' and B') of BME solutions in the presence of 1 mM gallic acid, ascorbic acid, Trolox or α -tocopherol measured using an ITO electrode (A and A'), and an F-ECR electrode (B and B').

BME 中における電気化学測定は、その他の電極についても行った。GC 電極、Au 電極、HOPG 電極についてそれぞれ測定を行った結果を Figures 2-6～2-8 に示す。これまでの報告にあったように、Au 電極ならびに GC 電極では、親水性ならびに親油性物質の応答が同時に見られた。両親媒性電極の場合、電極の表面のコンディションによって電気化学的な応答は非常に影響を受けやすくなる。両親媒性電極に近接した liquid-liquid-solid 3つの界面における溶液構造の親水性-親油性のバランスは、電極のコンディションのわずかな変化によって容易に変化する。しかしながら、極端に表面の親水・親油性が極端に偏った ITO 電極や F-ECR 電極は、両親媒性電極にくらべて高い再現性と汚染に対する抵抗を示すことが明らかになった。Figure 2-9 に示すように繰り返し CV 測定を行うことで、電極表面の汚れによってピーク電流の減少が見られるにもかかわらず、溶媒による簡単な洗浄を行うことで電極が容易に元どおりの状態に戻る。このように、BME による電気化学的分析は、親油性、親水性抗酸化物質の定量にとどまらず、フローインジェクション分析への利用など実用性の非常に高い測定系であることが示された。また、電極表面の汚れに強く、簡単な溶媒による洗浄で、容易に再現性の高い結果が得られることから、BME 中での薄膜電極セルによる電気化学測定の可能性も合わせて示された。

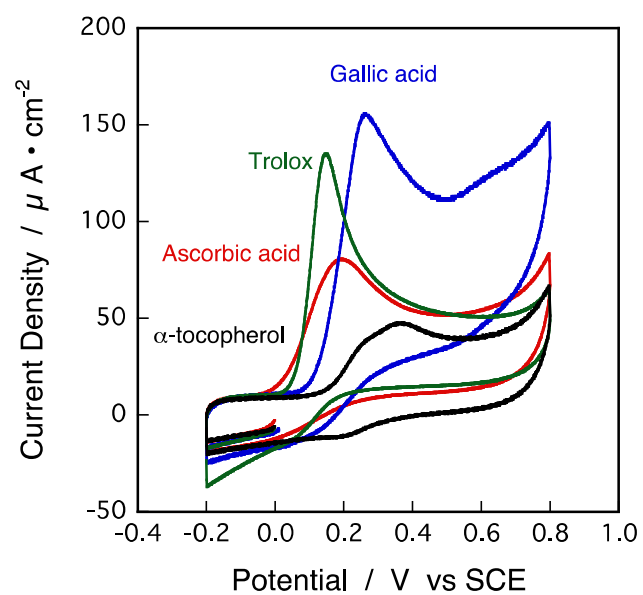


Figure 2-6. CVs of the BME solutions in presence of 1 mM gallic acid, ascorbic acid, Trolox or α -tocopherol measured using a polished GC disc electrode at 0.1 V/s.

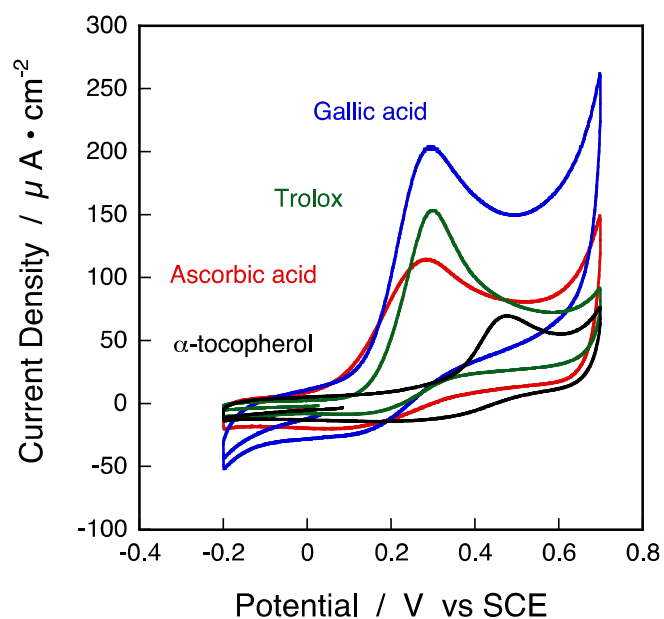


Figure 2-7. CVs of the BME solutions in presence of 1 mM gallic acid, ascorbic acid, Trolox or α -tocopherol measured using a polished Au disc electrode at 0.1 V/s.

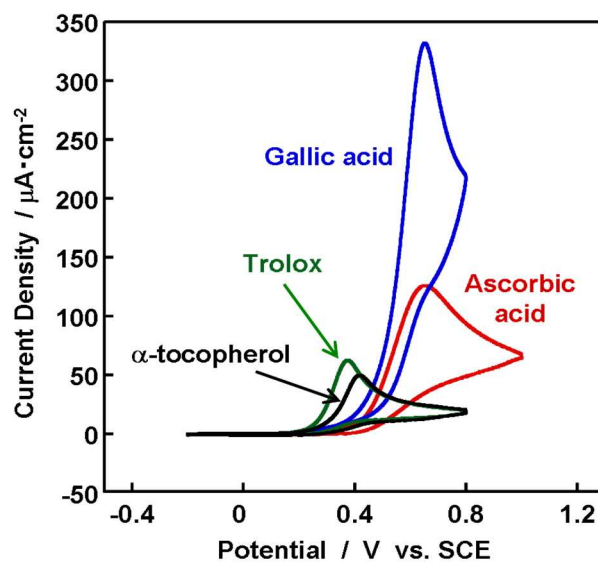


Figure 2-8. CVs of the BME solutions in presence of 1 mM gallic acid, ascorbic acid, Trolox or α -tocopherol measured using a HOPG electrode at 0.1 V/s.

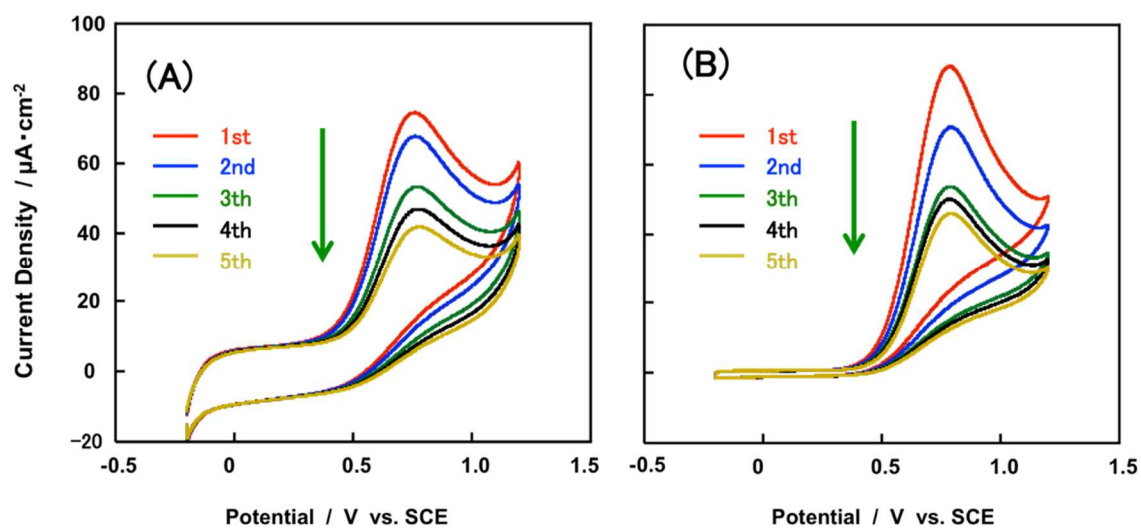


Figure 2-9. Periodic cycled CVs conducted to start with approximately 10 sec intervals of the BME solutions in the presence of 1.0 mM torolox measured using ITO (A) and F-ECR (B) electrodes at 0.1 V/s.

Figure 2-10 ならびに Figure 2-11 に ITO 電極、F-ECR 電極の高い再現性、電流応答の正確性を示す。Figure 2-10 は、BME 中における 1 mM Trolox の ITO 電極ならびに F-ECR 電極での CV である。いずれも測定の前に methanol、純水、toluene で洗浄を行ったのち、それぞれ測定を行った。いずれの電極も高い再現性、安定性を示し 3 つの異なる電極でそれぞれ 5 回ずつ、合計 15 回測定を行った時、ピーク電流の変動係数はそれぞれ 2.9, 1.3 % であり、非常に低い値を示した。比較として行った Folin-Ciocalteu 法による定量では 1.6 % (N=3) であり、F-ECR 電極では従来法よりも高い再現性を示した。

特に BME のようなエマルションは、容易に親水性化合物、両親媒性化合物ならびに親油性化合物を溶解するためクリーニング溶液として振る舞い、電極の汚染や被毒を妨げ、高い再現性、安定性を示すものと考えられる。HOPG も BME 溶液において親水性の $K_3Fe(CN)_6$ や親油性の ferrocene に対し親油性の高い電極として作用する³¹。しかしながら、Figure 2-8 に示すように、HOPG 電極において本来検出されるべきではない親水性の ascorbic acid や gallic acid の吸着による酸化電流が見られるため、F-ECR 電極と比較して抗酸化物質の選択的な分析として不十分である。このような HOPG 電極での汚染は、HOPG 電極表面のエッジあるいは欠陥にカルボキシ結合により、親水性の ascorbic acid と gallic acid が吸着し、引き起こされるものと推察される。そのため、HOPG 電極は BME 中におけるモデル抗酸化物質の CV 測定においては適しておらず、極度に平滑で化学的に不活性な表面を持つ F-ECR 電極表面が分析における汚染の抑制に寄与し、親油性抗酸化物質の測定に適していると考えられる。

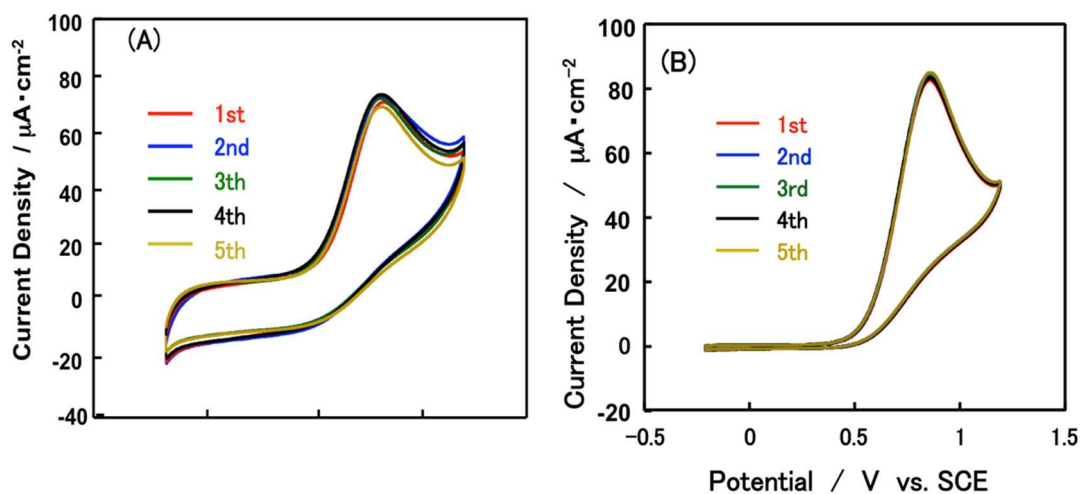


Figure 2-10. Repeating measurements of CVs of the BME solutions in the presence of 1 mM Trolox with (A) ITO and (B) F-ECR electrodes at 0.1 V/s. Prior to each CV measurement, flushing with methanol, pure water, and toluene was conducted.

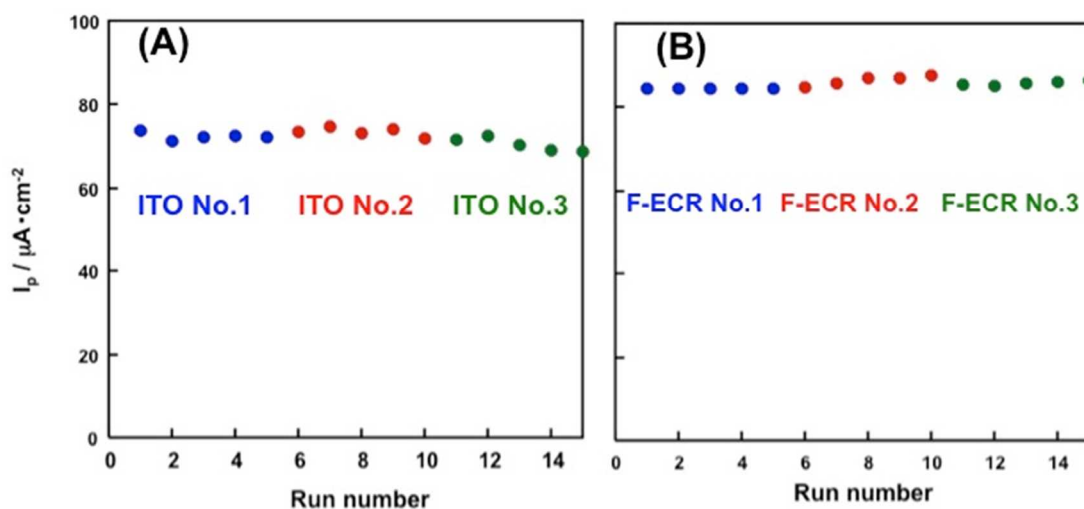


Figure 2-11. Reproducibility ($n=15$ with the three different electrodes) of peak currents by repeating CV measurements obtained at 0.72 V and 0.90 V of the BME solutions in the presence of 1 mM Trolox using three different (A) ITO and (B) F-ECR electrodes at 0.1 V/s, respectively. Prior to each CV measurement, the ITO electrodes were flushed with methanol and pure water, and the F-ECR electrodes were flushed with toluene for cleaning.

Figure 2-12 の(A)ならびに (B) に BME 中における ITO 電極ならびに F-ECR 電極による gallic acid, ascorbic acid, Trolox および α -tocopherol の検量線を示す。 R^2 は、それぞれの化合物の検量線から求めた相関係数である。すべての化合物の酸化ピークは、濃度に比例し、非常に良い相関が見られた (>0.996)。Figure 2-13 は、0.1 mM 以下の ITO 電極における gallic acid, ascorbic acid ならびに Trolox のそれぞれ 0.41, 0.72 ならびに 0.61 V おけるピーク電流と濃度との関係である。この時、親水性の ITO 電極を使用しているため α -tocopherol は、検出されていない。Figure 2-14 は、0.1 mM 以下の F-ECR 電極における Trolox ならびに α -tocopherol のそれぞれ 0.90 ならびに 0.69 V おけるピーク電流と濃度との関係である。同様に親油性の F-ECR 電極を使用しているため親水性の gallic acid, ascorbic acid は、検出されていない。以上の結果からもすべての化合物の酸化ピークは、濃度に比例し、0.01 mM から 10 mM の濃度範囲において非常に良い相関が見られ、ミクロ水相ならびにミクロ油相において酸化電流を測定することにより抗酸化物質の濃度を測定できることが明らかとなった。

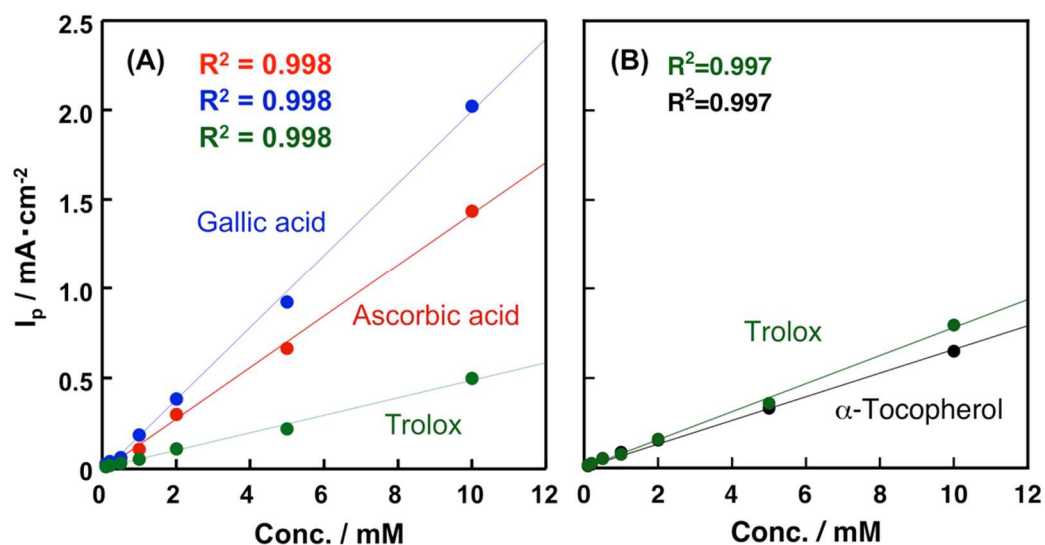


Figure 2-12. Calibration curves of the gallic acid, ascorbic acid, Trolox and α -tocopherol measured using an ITO (A) and an F-ECR (B) electrode at 0.1 V/s in the BME solutions. R^2 values are correlation coefficients of each compound calculated from its calibration curve.

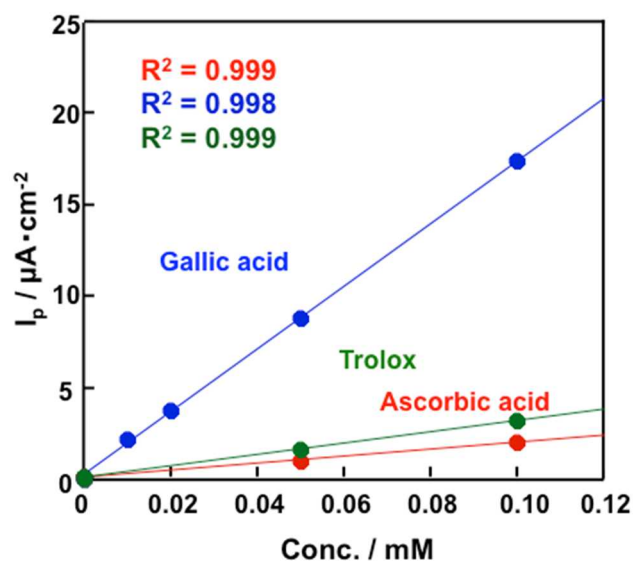


Figure 2-13. Calibration curves of ascorbic acid (red dots), teolox (green dots) and gallic acid (blue dots) for the low concentration region less than 0.1 mM in the BME solutions measured at 0.41, 0.72 and 0.61 V, respectively, using ITO electrodes at 0.1 V/s.

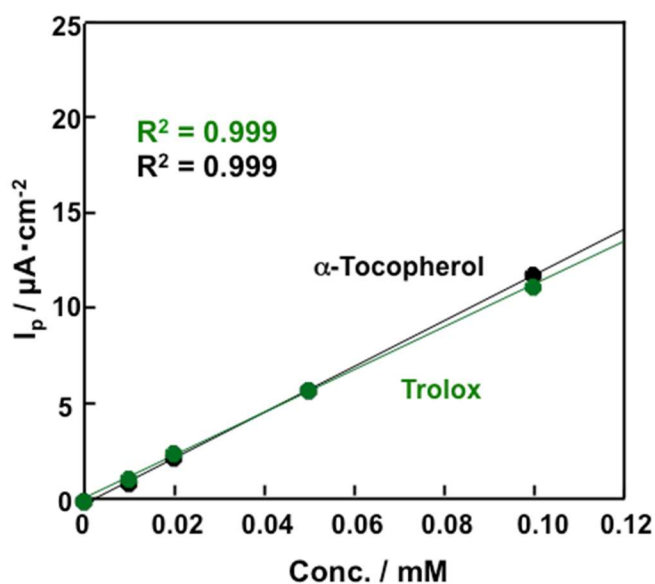


Figure 2-14. Calibration curves of Trolox (green dots) and α -tocopherol (black dots) for the low concentration region less than 0.1 mM in the BME solutions measured at 0.90 and 0.69 V, respectively, using F-ECR electrodes at 0.1 V/s.

Figure 2-15 に 1 mM ascorbic acid ならびに 1 mM α -tocopherol となるように BME の混合溶液を作成し、それぞれ ITO 電極 (A)、F-ECR 電極 (B) で測定した CV を示す。親水性の ITO 電極では、親水性化合物である ascorbic acid の酸化ピークがみられ、ascorbic acid と α -tocopherol の混合溶液であるにもかかわらず親油性化合物である α -tocopherol の酸化ピークは全く見られなかった (Figure 2-15A)。それに対し、親油性の F-ECR 電極では、親油性化合物である α -tocopherol の酸化ピークがみられ、ascorbic acid の酸化ピークは全く見られなかった (Figure 2-15B)。混合溶液中での ITO 電極による ascorbic acid のピーク電流と F-ECR 電極による α -tocopherol のピーク電流は、個々の溶液のピーク電流と良く一致し、全く干渉が見られないことが明らかとなった。

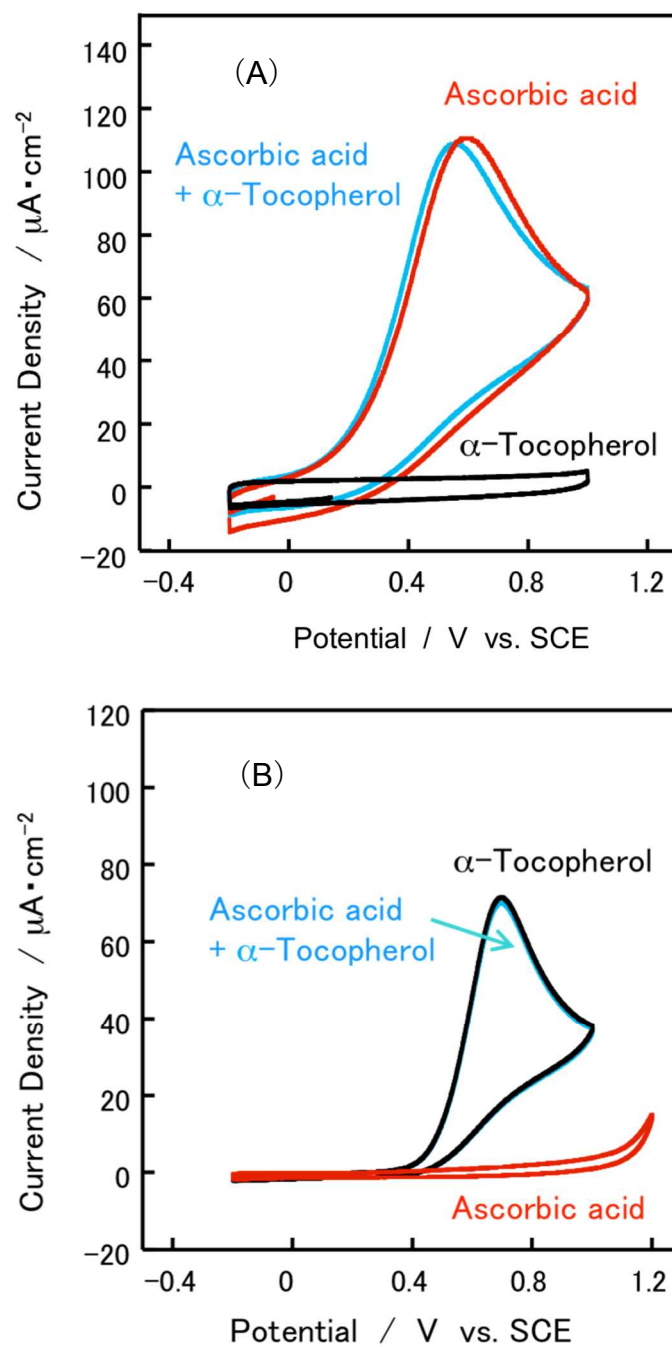


Figure 2-15. CVs of a mixed BME solution in the presence of 1 mM ascorbic acid and 1 mM α -tocopherol using (A) an ITO and (B) an F-ECR electrode at 0.1 V/s.

2-5 BME-EC 法による食品サンプルの抗酸化能評価

前節では、BME-EC 法によるモデル物質の抗酸化能評価を行いその可能性を検討した。その結果、極端に電極表面の親水・親油性が偏った ITO 電極や F-ECR 電極を用いることで、同一の混合溶液から親水性抗酸化物質ならびに親油性抗酸化物質をそれぞれ個別に定量できることを明らかにした。さらに本節では、BME-EC 法により機能性を有する液体の食品の実際の抗酸化活性を電気化学分析により評価することを試みた。BME-EC 法の適用事例として、缶コーヒー、エクストラバージンオリーブオイル(extra virgin olive oil, EVOO)^{35,48-50} の抗酸化能を評価した。

2-5-1 試料調整

Table 2-2 に示す方法であらかじめ BME を調整した。3 層構造となるエマルションのうち中間相を取り出し BME 溶液とした。機能性を有する液体の食品サンプルとして EVOO (“BOSCO Premium Extra Virgin Olive oil”, The Nisshin OilIIO Group, Ltd., Japan)ならびに缶コーヒー(“Healthya Coffee”, Kao Corporation, Japan)をそれぞれ 0.2 mL、BME 溶液 3.8 mL に加えた。その後、BME 試料溶液を穏やかに攪拌し、CV 測定のための試料とした。さらに EVOO と缶コーヒーに、0.1 mM α -tocopherol と 0.25 mM caffeic acid をそれぞれに加えた試料も調整した。添加した α -tocopherol ならびに caffeic acid の濃度は、BME に混合する前の濃度とした。また、5% v/v EVOO ならびに缶コーヒーを加えることによって BME 溶液の相構造の明らかな変化は、見られなかった。

2-5-2 食品サンプルの抗酸化能評価

Figure 2-16 に EVOO ならびにコーヒーを添加した BME 溶液の CV を示す。Figure 2-16A は、ITO 電極による BME ブランク溶液、5 v/v% EVOO、0.1 mM α -tocopherol を添加した 5 v/v% EVOO、5 v/v% canned coffee、0.25 mM caffeic acid を添加した 5 v/v% canned coffee の CV である。Figure 2-16B は、同じサンプルを F-ECR 電極で測定した CV である。

ITO 電極による BME 中の測定において、EVOO の CV は、BME Blank と比べて応答がほとんど変わらなかった。これは、ミクロ水相中には EVOO 中の抗酸化物質はあまり分配していないためであると考えられる。次に缶コーヒーでは、0.2 V から 1.0 V にかけてブロードの酸化ピークが確認され、F-ECR 電極では、急激に増加する酸化ピークが観測された。EVOO の場合には、F-ECR 電極ではブロードの酸化ピークが確認され、ITO 電極では、親水性の抗酸化物質を含んでいないために酸化ピークは全く観測されなかった。さらに、BME-EC 法の分析的な可能性を証明するために、添加物として 0.25 mM caffeic acid を添加した缶コーヒーならびに 0.1 mM α -tocopherol を添加した EVOO の測定を行った。

缶コーヒーの測定では、ITO 電極による測定において、0.72 V にブロードの酸化ピークが確認された。さらに、0.25 mM caffeic acid を加えたコーヒーの CV は 0.72 V 付近の酸化ピークが増加しており、その電流値は 1.45 倍となった。コーヒーならびに caffeic acid を添加した缶コーヒー二つの BME 溶液でのピーク形状の類似性の判断により、缶コーヒーで検出された酸化ピークは、おもに caffeic acid によるものであると考えられる。この時、缶コーヒー中の caffeic acid の濃度は、ITO 電極による 0.72 V での電流の測定から 0.56 mM であると推定された。Figure 2-16B は F-ECR 電極の結果である。コーヒーの CV では、BME Blank と比べて 0.5 V 付近から高い酸化電流が発生していた。さらに、0.5 mM caffeic acid を加えた BME 溶液の CV を Figure 2-17 に示す。F-ECR 電極で測定した BME 中 caffeic acid 単独の CV においても、酸化電流は 0.5 V 付近から急激に増加した。実サンプルの CV では caffeic acid 単独の CV と形も酷似しているため、ミクロ有機相中にも caffeic acid を主とするポリフェノール類の応答が得られたと考えられる。実際のところ、ITO 電極、F-ECR 電極の両電極で検出されたことから caffeic acid は、両親媒性の物質であることも示された。

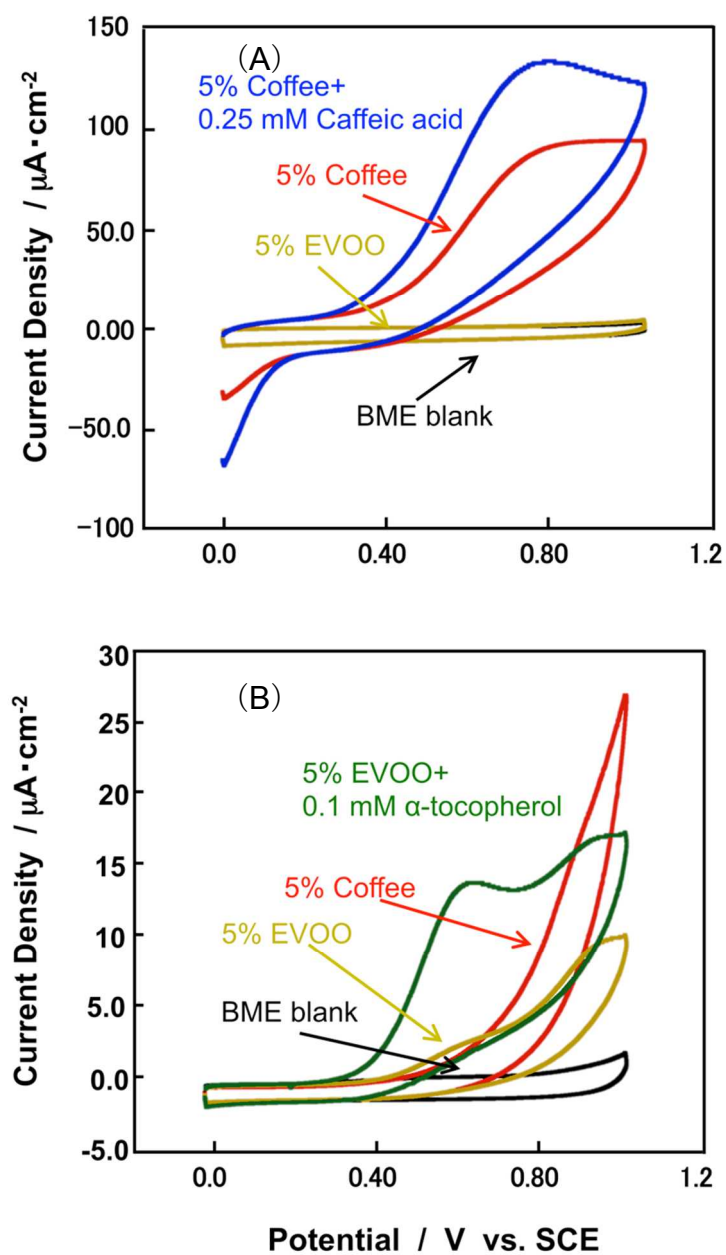


Figure 2-16. Typical CVs of the BME solutions in the absence and presence of 5 v/v% EVOO, 5 v/v% EVOO with 0.1mM α -tocopherol, 5 v/v% canned coffee and 5 v/v% canned coffee with 0.25 mM caffeic acid, using an ITO electrode (A) and an F-ECR electrode (B) at 0.1 V/s.

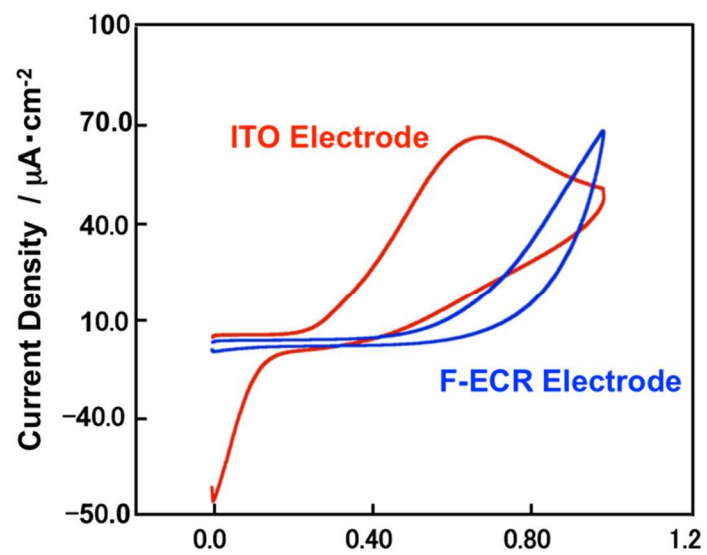


Figure 2-17. CVs of the BME solutions in the presence of 0.5 mM caffeic acid measured using ITO and F-ECR electrodes at 0.1 V/s.

EVOO の測定において ITO 電極では、 α -tocopherol の有無にかかわらず酸化ピークは検出されなかった。これは、ミクロ水相中には EVOO 中の抗酸化物質はほとんど分配していないためであると考えられる。F-ECR 電極による測定では、0.1mM α -tocopherol を添加した EVOO いずれのサンプルにおいて 0.63 V に明確な酸化ピークが確認された。実サンプルと 0.1 mM α -tocopherol を加えた EVOO の CV とを比較すると 0.63 V 付近の酸化ピークの電流値が 4.25 倍に増加した。また、EVOO 中の α -tocopherol の濃度は、F-ECR 電極による 0.63 V での電流の測定から 0.031 mM であると見積もられた。

これらの結果から BME 中の実サンプルにおける親水性・親油性抗酸化物質を ITO、F-ECR 電極を用いることで定性・定量することに成功した。

2-6 結 語

本章では、界面活性剤により親水性と親油性の溶媒が熱力学的に安定となる BME を反応場とし、代表的な抗酸化物質について電気化学的な分析を試みた。電極表面の親水性や親油性を制御することで BME 中におけるミクロ水相とミクロ油相への電気化学的なコンタクトを変化させ、同じ BME 中において親水性、親油性、両親媒性化合物のそれぞれ個々の抗酸化活性を個別に測定することを実現した。BME-EC 法を応用し BME 中で親水性と親油性物質の抗酸化能を個別に電気化学的に定量分析を行えるか検討を行った。その結果、機能性食品のための分析的な可能性を証明した。酸化ピーク面積より算出される電気量により、親水性化合物や親油性化合物などそれぞれ同時にトータルの抗酸化活性を評価できることを示した。

液体食品中の抗酸化活性は、 α -tocophenol のような代表的な抗酸化物質の総量濃度として見積もられた。このように本章で提案した新しい測定方法は、単に抗酸化物質の電気化学的なレスポンスを測定するだけであるが、酸化ピーク面積による電気量から液体食品中の抗酸化活性を測定することを可能とする。

本章では、極端に電極表面の親水性／親油性を変えた電極と親水性／親油性のバランスのとれた BME の組み合わせを用いることで、シンプルなサイクリックボルタンメトリー分析により抽出操作をすることなく、いくつかの化合物の抗酸化活性を明らかにした。様々な電極との組み合わせにより、BME 中の電気化学において同時マルチモード分析の方法を構築したとともに、機能性液体食品の抗酸化活性の分析の枠組みを越え、あらゆる分野に適用できる可能性を示した。

第3章 BME を用いたオリーブオイルの抗酸化能の評価

3-1 緒 言

オリーブ (*Olea Europea* L.) の果実より機械的圧搾により生産される olive oil のうち、とくにエクストラバージンオリーブオイル (extra virgin olive oil, EVOO) は、生物学的なシステムにおける酸素ラジカルを阻害する様々な抗酸化物質を含んでいる⁵¹。植物性オイルの中で、EVOO は非常に多くのフェノール化合物を含有し、食物のフェノール化合物の最も重要なグループは、フラボノイドや phenolic acids のようなポリフェノールである。トコフェロール類やカロテノイド類は親油性の抗酸化物質のグループを構成し、それらは、全体の酸化安定性を与える重要な化合物でもある^{52,53}。olive oil の生体利用が可能な天然物は、健康や疾病に関連する生理学的なプロセスにおいて有益な効果をもたらす⁵⁴。Olive oil のフェノール化合物が微生物の活性、酸化プロセスや炎症を改善するといった *in vivo* や *in vitro* を含めた様々な研究が実施されている⁵⁵。例えば、olive oil のフェノール化合物が活性酸素種 (ROS) を減少させるといった、相当なフリーラジカル阻害効果を引き出すことが見出されている⁵¹。その上、フェノール化合物を多く含む EVOO の摂取は、*in vivo* での DNA の酸化によるダメージを大幅に減少させる^{56,57}。これらの酸化における有益な効果は、抗酸化活性を持っている生物学的な化合物にある程度に帰する⁵⁸。水溶液系、有機溶媒系⁵⁹、エマルション系^{34,60,61}での電気化学分析はもとより^{3,25-27,62}、従来の化学的な分析によって食品中の抗酸化物質や生体利用可能なサンプルについて研究されている¹¹。

Olive oil の抗酸化能の分析的な評価は、主な抗酸化分子の濃度を検出することによっても行われる。Olive oil の機能性を評価するために抗酸化物質のへ関心が検討されることは、EVOO の抗酸化能の測定が、食品産業において重要な仕事の一つとなる。EVOO に含まれる抗酸化物質の同定や定量のためのいくつかの方法が報告されており、UV 検出器や質量分析器 (MS)^{35,63,64}を接続した High Performance Liquid Chromatography (HPLC)のようなクロマトグラフィーにより

異なる抗酸化物質の分離することが可能である。もう一つのアプローチとしてその手軽さから分光測定あるいは蛍光測定が用いられている。Folin-Ciocalteu 法¹⁶によって決定される総ポリフェノール量や oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法は、食品サンプル¹⁰の抗酸化物質の全体量を見極めた抗酸化能の決定に広く利用されている。通常、フェノール化合物は、両親媒性化合物であるため methanol のような極性有機溶媒中に抽出することができる^{61,65}。しかしながら、methanol にほとんど溶解しないいくつかの化合物は、完全に分配しない可能性がある。抗酸化能のかなりの量が olive oil 中に残ってしまっているために methanol 抽出液の ORAC 値は、過小評価となる。さらに溶液の濁りは分光測定において妨害し、再現可能な結果が得られない⁵³。

水と油がミクロスケールで両連続的に共存した BME 溶液は熱力学的安定系であり、親油性、両親媒性ならびに親水性化合物を同時に溶解する^{31-33,66}。第2章では、BME 溶液を使用し、抗酸化活性を評価するためのシンプルな電気化学分析 (BME-EC 法)を提案した。この方法は、親水性、両親媒性、親油性抗酸化物質を抽出することなく個別に測定する方法である⁶⁷。(Figure 3-1)

本章では、BME-EC 法を用いて olive oil の抗酸化活性を評価し、BME 溶液中における EVOO の電気化学的な特性を述べる。それらの抗酸化活性は、総ポリフェノール量や ORAC 分析を通して BME-EC 法と比較、評価もおこなった。本研究で提案する方法は、化合物の電気化学的な挙動に基づくトータルの抗酸化活性の直接分析であると考えうる。

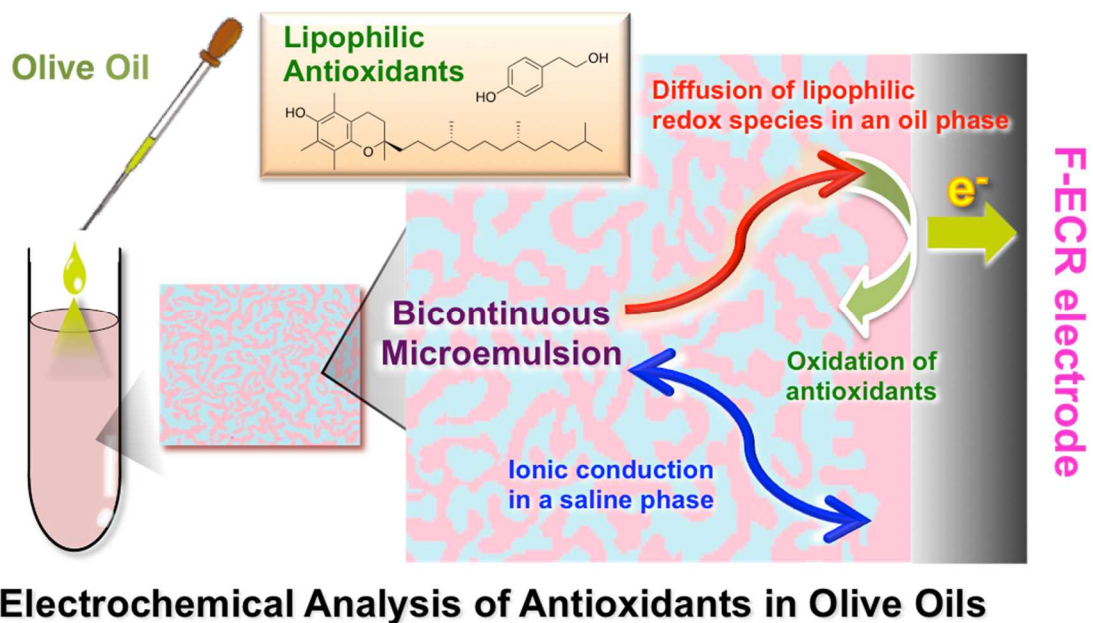


Figure 3-1. Schematic representation of electrochemical analysis in a BME system for evaluation the antioxidative power of olive oils.

3-2 実験

3-2-1 試薬、Olive oilサンプル

本章では第2章で述べたBMEを使用したため、BME作成に必要な試薬は割愛する。本章において、使用した試薬をTable 3-1に示す。試薬は、いずれも特級以上のグレードを使用し、溶液の調整には全て超純水を使用した。本章では、抗酸化能の比較対象とする抗酸化物質として、没食子酸 (Gallic acid)を、両親媒性抗酸化物質にはTrolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) を、親油性抗酸化物質には α -tocopherolを用いた。Olive oil サンプルは、地域の食料品店より購入した。

3-2-2 Olive oilの脂肪酸組成の解析

Olive oilの脂肪酸組成の解析には、市販の脂肪酸メチル化キットならびにメチル化脂肪酸精製キット (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を使用した。脂肪酸メチルエステルは、GC/MS (GCMS-2010 Plus, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)により測定を行った。カラムには、DB-23 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 μ m thickness (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)を使用した。キャリアーガスは、Heを使用し、GCの昇温プログラムは、50 °C 1 min Hold, 20 °C/min 170 °C, 4 °C/min to 220 °C 4.5 min Holdにて行った。インジェクションとディテクターの温度は、250 °Cとし、30 ~ 600 amuの質量範囲にて行った。GC/MSシステムの制御は、Shimadzu's GC/MS solution software, version 2.7を使用した。

Table 3-1. Materials

Materials	Product source
Ethanol 99.5%	Nacalai Tesque Co.
Methanol	Nacalai Tesque Co.
Phenol Reagent (Folin-Ciocalteu 試薬)	Nacalai Tesque Co.
Formic acid	Sigma-Aldrich
Acetonitrile	Sigma-Aldrich
Glyceryl trioleate (GTO)	Sigma-Aldrich
Tyrosol	TCI Co.
Gallic acid	Nacalai Tesque Co.
Trolox	TCI Co.
(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)	
α -Tocopherol	Nacalai Tesque Co.
Heptan	Sigma-Aldrich
AAPH	Sigma-Aldrich
(2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride)	

3-2-3 オイルならびに抗酸化物質を含むBME溶液の調整

α -Tocopherol/toluene 標準溶液(0, 4.8, 2.4, 1.2 and 0.59 mg/mL)、GTO ならびに ROO toluene 標準溶液 (0.5 g/mL) を BME 溶液と混合する前にあらかじめ調整した。濃度が明らかな α -tocoherol を加えたそれぞれの ROO、GTO oil サンプルは、GTO、ROO/toluene 標準溶液を含む α -tocoherol 標準溶液を 10 倍希釈して調整した。

(1) ROO、GTO サンプル調製

- ① α -tocopherol 95 mg を toluene に溶解し、10 mL メスフラスコにてメスアップし、一次標準液とした。一次標準液 (9.5 mg/mL)を Toluene で 4 倍希釈したのち、さらに段階的に希釈し、0、4.8、2.4、1.2、0.59 mg / mL となるように標準溶液を調製した。
- ② GTO、ROO 5.0 g を toluene で溶解させ、10 mL メスフラスコにて Toluene でメスアップした。
- ③ α -tocoherol 標準溶液をそれぞれ(1)の②で作成した GTO、ROO toluene 溶液で 10 倍希釈し、BME 900 μ L に 100 μ L 加えることで GTO、ROO サンプルとした。

(2) Oil を含まない α -tocopherol 標準溶液の調製

- ①の α -tocopherol 標準溶液を toluene で 10 倍希釈し、BME 900 μ L に 100 μ L 加えることで oil なしのサンプルとした。つまり、BME サンプルには GTO、ROO のような oil は含まれていない。

(3) Olive oil サンプルの調製

Olive oil サンプル 5.0 g を toluene で溶解させ、10 mL メスフラスコにて Toluene でメスアップした。BME 900 μ L に 100 μ L 加えることで BME サンプルとした。この時、BME サンプル中に olive oil は、5 % (w/v) 含む。

3-2-4 フェノール化合物の抽出

フェノール化合物抽出方法は、基本的にBenedettiらによって報告された方法にて行った。10mLのmethanol溶液にolive oil サンプル 5 gを加え2 分間、室温にてボルテックスを行ったのち、10分間、5000×gにて遠心分離を行った。上清を取り出し、もう一度同様に抽出を行った。2つの上清を合わせ、最終的な体積を記録し冷蔵保存した。LC-MS分析の前には、上清をmethanolで希釈したのち0.2 µm のフィルター (PTFE)で濾過を行った。

3-2-5 超臨界クロマトグラフィー (SFC) ならびに LC-MS による抗酸化物質の定量

オイルサンプル中の α -tocopherolの含有量は、二酸化炭素超臨界クロマトグラフィー^{68,69} (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) により分離、定量を行った。SFCは、デガッサー、バイナリーグラジエントポンプ、オートサンプラー(10 °C)、カラムオーブン(50 °C)からなるAcquity Ultra Performance Convergence Chromatography™ (UPC²; Waters, Milford, MA)にて行った。分離は、ACQUITY UPC² BEH カラム (3.0 mm i.d.×100mm; 1.7 µm particles size, Waters)にて行った。移動相は、CO₂ (solvent A)、methanol with 0.2% ギ酸 (solvent B)を使用し、流量は、2.5 ml/minとした。移動相のグラジエントは、99 % A にて0.3 min, 95 % A 1.8 min, トータルの分析時間は 2.1 minであった。オイルサンプルは、あらかじめheptaneで希釈し、UPC²に2 µl注入した。Oil中の α -tocopherolの量は、標準物質の294 nmにおけるクロマトグラムから検量線を作成し、算出した。抽出液中の α -tocopherolの検量線から決定した。機器の制御は、Waters社製のEmpower3により行った。

3-2-6 LC—MSによるTyrosol濃度の定量

Olive oil中のtyrosolは、LC-MSのSIR法により定量を行った。クロマトグラフィーによる分離は、UPLC (Ultra Performance LC) システム (Waters, Milford, MA) を使用し、ACQUITY UPLC BEH C18 カラムにより (2.1 mm i.d.×50mm; 1.7

μm particles size, Waters) 行った。オートサンプラーは、4 °Cを保ち、カラムオーブンの温度は、35 °Cとした。移動相の流量は0.2 ml/minとし、すべてのインジェクションボリュームは2 μl とした。Solvent A は、水 with 0.1% NH_4OH 、solvent B は、acetonitrileとした。移動相のグラジエントは、85 % A 2 min hold、5 % A 2.5 min、85 % A 3.0 min とし、トータルの分析時間は 7.5 minであった。質量分析計は、Micromass Quattro *micro* API triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA)を使用し、ES-モードにて行い、脱溶媒ガスは窒素を用いた。Quattro Micro (QM)のパラメーターは source temperature, 120 °C; desolvation temperature, 350 °C; cone gas flow, 50 l/h; desolvation gas flow, 600 l/hとした。QMのキャピラリー電圧は3500 Vとし、tyrosolのSIR transition は、 m/z 137.21、dwell time 0.1 s, cone voltage 29 Vとした。データは、Waters 社製のMassLynx ならびに QuanLynx software にて行った。

3-2-7 総ポリフェノール量の定量

総ポリフェノールの定量は、Folin-Ciocalteu 試薬 (Phenol Reagent)ならびに gallic acid (GA) を標準試薬として使用し決定した¹⁶。96 well マイクロプレートに試験液 20 μL それぞれ取り、これにフェノール試薬 10 μL 、加えてよく混合した。続いて 10 %炭酸ナトリウム溶液 40 μL を加え、さらに水 130 μL を加えてよく混合し、十分に発色させたあと、750 nm の吸光度は、Varioskan Flash Multimode Reader (Finland)を用いて測定した。標準溶液には、100 $\mu\text{g/mL}$ 没食子酸標準溶液から、5、10、20、50 $\mu\text{g/mL}$ の溶液をそれぞれ調整し、同様に操作して得た検量線から oil 中の総ポリフェノール量を GA の当量濃度 mg GAE/kg として求め評価した。

3-2-8 ORAC Assay

Oil中の抗酸化活性の決定は、AAPHをペルオキシラジカルの発生源とし標準試薬にはTrolox、蛍光probeにはfluoresceinを用いて蛍光測定によるORAC assay⁶⁵により行った。96 wellマイクロプレートに、25 μl の希釈したサンプル、ブラン

クあるいはTrolox標準溶液(0–100 μmol)をとり、150 μl のfluorescein溶液 (4 $\mu\text{mol}/\text{well}$) を加えて37 °C、15 minインキュベートした。その後、25 μl AAPH 溶液 (173 mmol/l)を各wellに加え、37 °C、励起波長485 nm、検出波長525 nmにて蛍光の減衰をVarioskan Flash Multimode Reader (Finland)を用いて2 minごとに2 h 測定を行った。ORAC値は、蛍光強度の減衰曲線 (Area Under the Curve, AUC)とブランクでのAUCの差 (Net AUC)から算出した。

3-2-9 BME中での電気化学測定 (BME-EC法)

BME-EC 法に使用した BME 溶液はすでに第2章で述べた BME 溶液と同じ組成のものを使用したため、BME 作成に必要な試薬は割愛する。Figure 3-2 に olive oils 中の抗酸化物質の定量分析フローを示す。Gallic acid ならびに α -tocopherol を含む BME 溶液は、gallic acid 水溶液ならびに α -tocopherol/2-butanol 溶液 (50 mM)をそれぞれ加えて調整した。Olive oils あるいはモデル oil の BME 溶液は、10 % (v/v) の oil-toluene 溶液と 90 % (v/v) の BME 溶液を室温で1分間ボルテックスして調整した。5 % (w/v)の oil サンプルの添加による BME 溶液の相構造の明らかな変化は見られなかった。Gallic acid ならびに α -tocopherol、tyrosol の BME 中の濃度は、均質の水相、toluene 溶液の見かけの濃度として定義した。

電気化学測定は、それぞれのモデル抗酸化物質ならびに olive oil サンプルを BME に溶解し、作用極として親水性の ITO 電極、親油性の F—ECR 電極を用いた。電気化学測定は、電気化学測定装置 (ポテンショスタット, ALS Electrochemical Analyzer ALS600E) (BAS Inc., Japan)を使用し、サイクリックボルタンメトリー (Cyclic Voltammetry, CV)により、親水性ならびに親油性抗酸化物質の定量分析を行った。Pt 線 (対極)、参照電極 (R.E.)として飽和カルメロ電極 (SCE, +244 mV vs. SHE at 25 °C, BAS Inc., Japan) を含めた3電極を BME 溶液に浸して測定を行った (Figure 3-3) 。また、CV の繰り返し測定による電極表面の汚染を防ぐため、実験は全て First Scan で行った。温度は 25 °C (室温)で測定を行った。また、特に脱気は行わず測定を行った。F-ECR 電極の面積は、内径 5 mm ϕ の O-リングにより規制し、幾何学的な面積を電極面積とした。

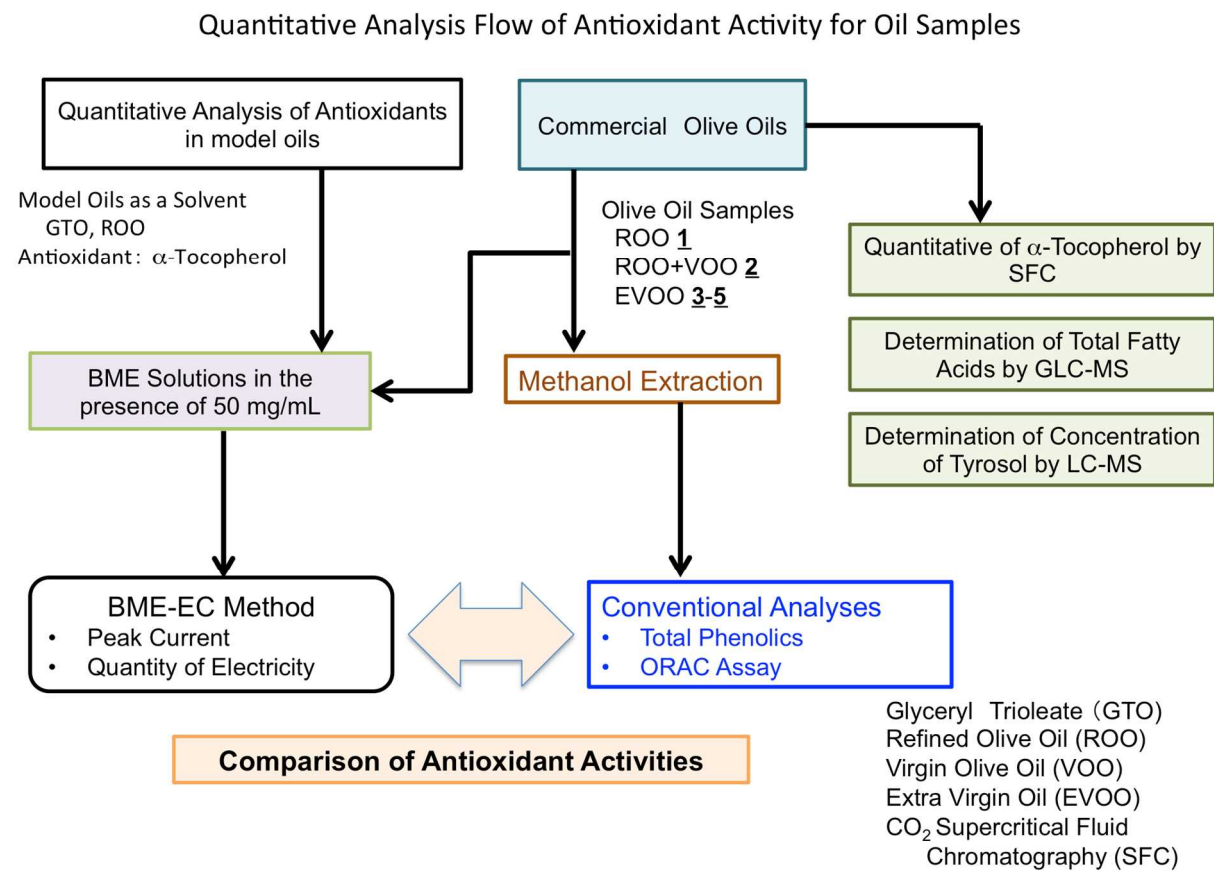


Figure 3-2. Quantitative analysis flow of antioxidant activities for olive oils.

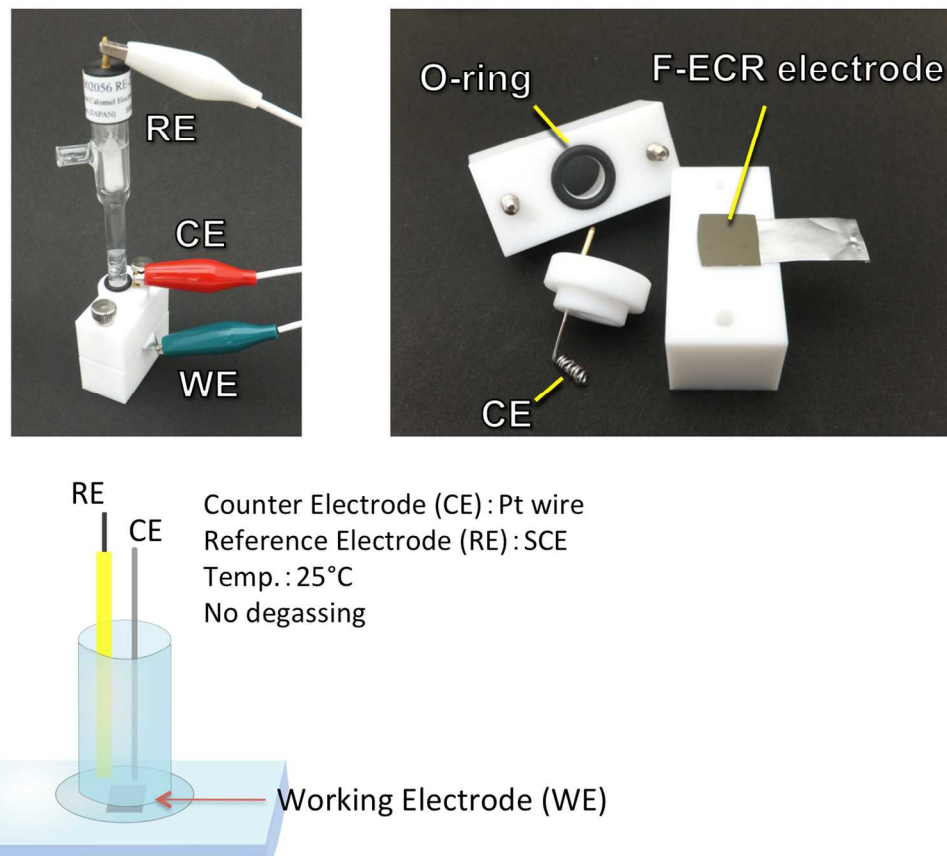


Figure 3-3. Typical set up of the electrochemical cell for evaluation of antioxidants in olive oils by BME-EC method.

3-3 オリーブオイルの脂肪酸組成の解析と抗酸化活性の評価

F-ECR電極を用いたBME電気化学によるolive oilsの抗酸化活性の測定能力を確認するために、Table3-2に示すいくつかのoil サンプル, refine olive oil (ROO), refined olive oil と virgin olive oilの混合 oil (R-VOO), extra virgin olive oils (EVOOs) について評価した。電気化学的な分析を行う前にあらかじめこれらのolive oilサンプルについて一般的な含有量の分析を行った。

Olive oilの脂肪酸は、おもに各種脂肪酸のトリグリセリドから構成される。Olive oilの定量的な特性は、グリセリドの脂肪酸の組成により評価される。一般的にolive oilの主な脂肪酸の組成は、モノ-不飽和脂肪酸であるオレイン酸でありおおよそ60 %含まれている。また、olive oilには、約25 %の飽和脂肪酸であるパルミチン酸も含まれる。

α -Tocopherolならびにtyrosolのolive oilの濃度は、olive oil中の主な抗酸化物質として知られているため、クロマトグラフィーにより決定した。特に α -tocopherolは、しばしば抗酸化物質の指標として用いられる。用いたサンプル中の最も低い α -tocopherol含有量は、EVOO 5の105 mg/kg、最も高い値は、ROO 1の203 mg/kgであった。これらの値は、先行研究⁵²により報告されている市販のolive oilsの121 – 369 mg/kgとよく一致した。最も高価なEVOO 4は、tyrosolの濃度が非常に高かった。それぞれの抗酸化性の分子の濃度ではなく、食品の評価においてトータルの抗酸化物質の評価が最終的には重要である。Table 3-2にolive oilの抗酸化活性として総ポリフェノール量ならびにORAC値の結果を示す。総ポリフェノール量ならびにORAC測定は、食品化学において広く用いられている。総ポリフェノール測定は、Folin-Ciocalteu法として知られ、フェノール性水酸基の還元力をgallic acid相当量 (GAE)として測定される。ORAC測定は、ペルオキシラジカルに対するフリーラジカルの消去能として測定され、Szydlowska-Czerniak²¹らや Ramos-Escudero ら³⁴により市販のolive oil中の総ポリフェノール量とORAC値に相関があることを報告されている。両グループは、含有量や測定対象物が全く異なるにもかかわらず良い関係にあると論じている。実際のところ、サンプルの α -tocopherol含有量が約190 mg/kgと近い値であったにもかかわらずolive oil サ

サンプル1–3 の総ポリフェノール量は、それぞれ30.9, 52.9, 123 GAE mg/kg となり ORAC 値は、0.21, 0.97, 2.78 mmol TE/kgとなった。EVOO 3 の総ポリフェノール量とORAC値は、ROOよりも高い値を示すことが明らかとなった。一般に、EVOOは、抗酸化活性が高いことが知られている。EVOOs 3 – 5のサンプル間では、総ポリフェノール量とORAC値が高かったサンプルは、EVOO 4で、最も低かったサンプルは、EVOO 5であった。推定された抗酸化活性の強さは、おおよそ市販価格に従った。

Table 3-2. Compositions of fatty acids (%), concentrations of TOC and tyrosol, and antioxidant activities of the olive oils applied.

Samples	Refined olive oil	Refined olive oil and virgin olive oil	Extra virgin olive oils samples		
	1	2	3	4	5
Source	Imagine, Inc. (Japan)	Spain	Spain	Italy	J-OIL MILLS, INC. (Japan)
Compositions of Fatty acids (%)					
Myristic, C _{14:0}	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03
Palmitic, C _{16:0}	25.8	24.3	25.4	24.0	30.3
Palmitoleic, C _{16:1}	0.8	0.6	0.6	0.4	0.8
Stearic, C _{18:0}	6.6	6.2	6.6	5.6	5.7
Oleic, C _{18:1}	61.8	63.7	63.1	60.1	55.7
Linoleic, C _{18:2}	4.5	4.9	4.3	9.4	7.5
Linolenic, C _{18:3}	0.5	0.4	-	0.5	-
Concentrations of Antioxidant spices					
TOC ± SD (mg/kg) ^a	203 ± 5.2	181 ± 27	193 ± 11	168 ± 18	105 ± 9.8
Tyrosol ± SD (mg/kg) ^b	No detected (< 1.0)	3.29 ± 0.11	11.4 ± 0.00	82.7 ± 0.57	11.0 ± 0.06
Antioxidant activities					
Total phenolics ± SD (GAE mg/kg) ^c	30.9 ± 9.1	52.9 ± 7.0	123 ± 8.2	146 ± 7.9	85.9 ± 5.3
ORAC value ± SD (mmol TE /kg) ^d	0.21 ± 0.02	0.97 ± 0.02	2.78 ± 0.04	3.04 ± 0.09	1.51 ± 0.04

Compositions of the fatty acids were measured by GC/MS after saponification and methylation. Concentrations of TOC and tyrosol, total phenolics and ORAC value were measured by SFC^a, LC/MS^b, Folin-Ciocalteu method^c and ORAC assay^d, respectively. ^{a-d} *n* = 3.

3-4 BME—EC法によるオイル中の抗酸化物質の評価

水と油がミクロスケールで両連続的に共存したBME溶液は熱力学的安定系であり、親油性、両親媒性ならびに親水性化合物を同時に溶解する。BME中におけるミクロ水相とミクロ油相への電気化学的なコンタクトは、電極表面の親水性や親油性を制御することで交互にあるいは同時にもたらすことができる。したがって、同じBME中において親水性、親油性、両親媒性化合物のそれぞれ個々の抗酸化活性を個別に測定することが可能となる⁶⁷。

総ポリフェノール量の測定における標準物質である親水性のgallic acidとolive oil中の主な抗酸化物質である親油性の α -tocopherolをそれぞれ添加した溶液ならびにgallic acidと α -tocopherolの混合溶液のBME中でのサイクリックボルタモグラムをFigure 3-4に示す。親油性のF-ECR電極では、0.69 Vに親油性の α -tocopherolの不可逆な酸化ピークが観測された。しかしながら、親水性のgallic acidの電気化学的な応答は、まったく検出されなかったことから、F-ECR電極では、ミクロならびにマクロtoluene相中においてgallic acidは検出されないことが明らかとなった。gallic acidと α -tocopherolの混合溶液中でのF-ECR電極によるCVでは、 α -tocopherolのピーク電流は、個々の溶液のピーク電流と良く一致し、gallic acidとの干渉が全く見られないことが明らかとなった。

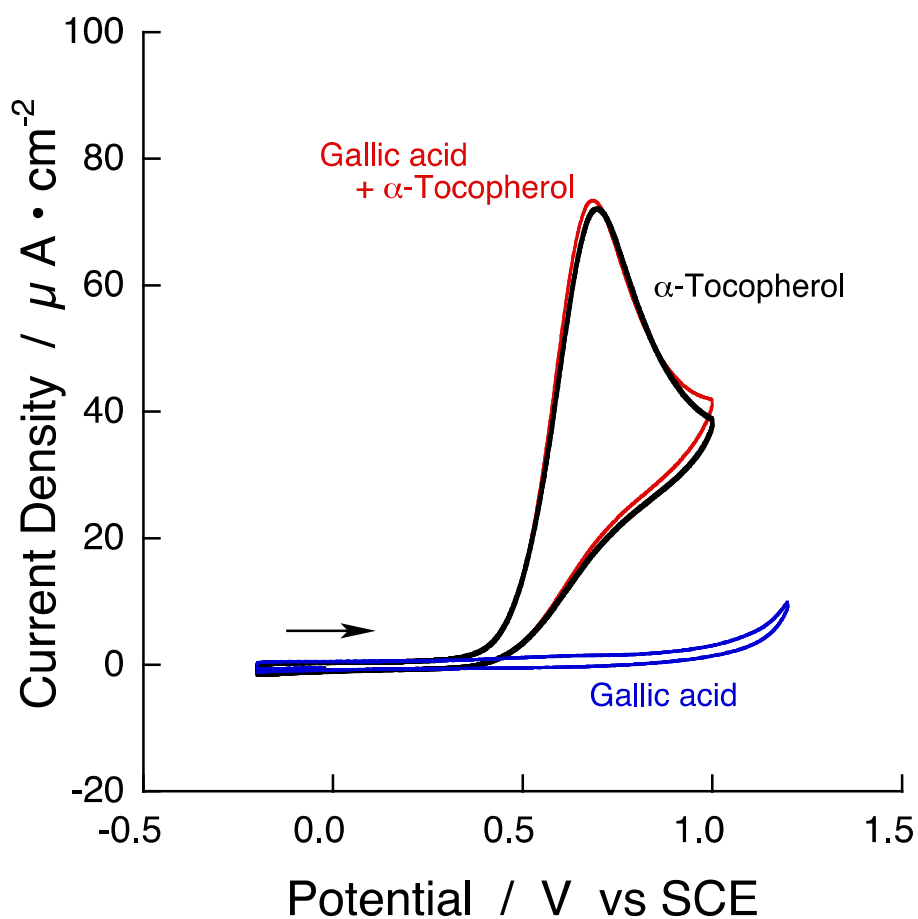


Figure 3-4. Cyclic voltammograms (CVs) of BME solutions in presence of 1 mM GA (blue line), 1 mM α -tocopherol (black line), and 1 mM GA+ α -tocopherol (red line) using F-ECR electrode. Scan rate, 0.1 V/s.

機能性液体食品の実際の抗酸化活性を評価において、親水性ならびに親油性電極を用いたBME中での電気化学的な測定が非常に有用であることを証明するために、olive oilについてBME溶液の電気化学による評価をおこなった。ITO電極によるROO 1を5 % (v/v)添加したBME溶液と何も添加していないBME溶液のCVをFigure 3-5に示す。ROO 1では、親水性のITO電極による電気化学的な応答は全く観測されず、抗酸化物質が存在するにもかかわらず何も添加していないBME溶液のCVとよく一致した。一般に、olive oilの総ポリフェノール量ならびにORAC測定では、olive oilからmethanol溶液によって抽出された化学物質の分析を行う^{52,53,70}。それゆえ、olive oilに含まれる抗酸化物質のほとんどは、両親媒性化合物であると言われている⁶⁰。これらの結果は、BME中のミクロ水相に抗酸化物質がほとんど存在していなかったことを示している。言いかえるならば、olive oil中に親水性あるいは両親媒性の抗酸化物質はほとんどないことを意味しているが、これらの現象は、ミクロ水相が高い塩濃度であることに注意されるべきであり、BME中のミクロ油相へ塩析していることによるものと考えられる。

一方、親油性のF-ECR電極は、olive oil中で抗酸化活性の電気化学的な明らかなレスポンスが得られ、olive oil中に親油性あるいは両親媒性の抗酸化物質の存在を示している。Figure 3-6 (A)ならびに(B)に、F-ECR電極による5 % (v/v) GTOならびに ROO を添加したBME溶液のCVを示す。GTOはolive oilを構成するおもなトリグリセリドの一つであり、抗酸化物質を含まないolive oilのモデル物質として適用した。GTOでは、酸化ピークが全く検出されないことが容易に期待できる。定量的な評価のために、BME溶液に様々な濃度の α -tocopherolを加えた。 α -tocopherolは、0.69 Vに酸化ピークが得られ、olive oilモデル溶液中の α -tocopherolの濃度の増加に伴い、ピーク電流は比例するように増加し、非常に定量性の高い分析法であることを示した。それゆえ、GTOの代わりにROO 1を用いて同様の実験を行った。様々な濃度の α -tocopherolを加えたROO をBME溶液に5 % (v/v) となるように溶解し、F-ECR電極用いてCV測定を行った (Figure 3-6B)。Figure 3-6AにおけるGTOの場合とは対照的に、ROO 1 では自然に α -tocopherolを含んでいるため、0.69 Vに α -tocopherolによる酸化ピークが観察された。

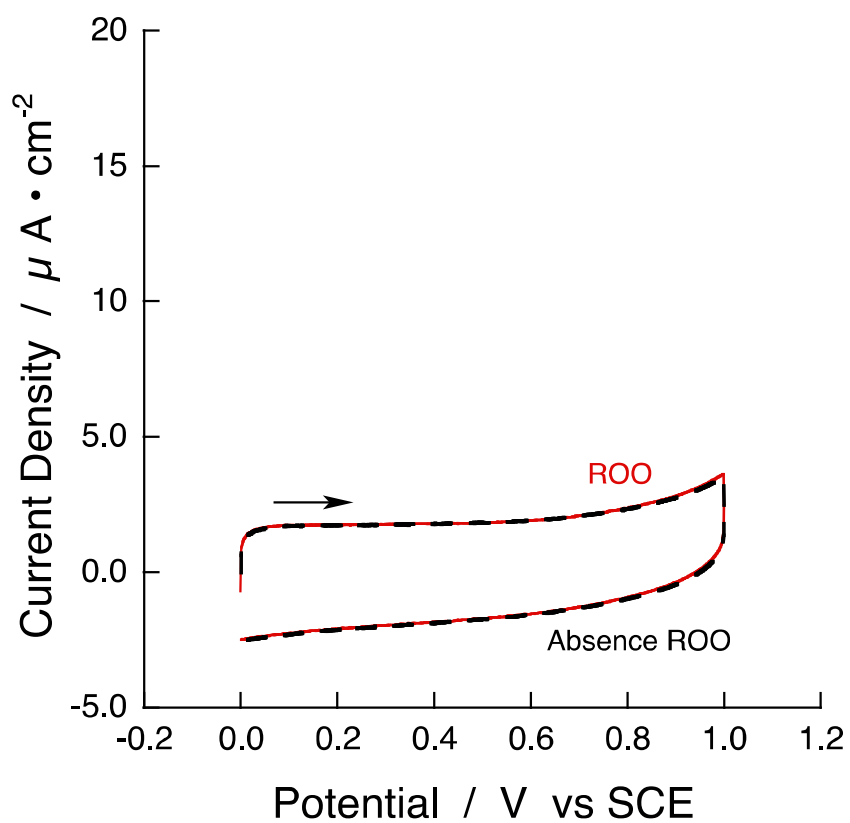


Figure 3-5. The BME solutions in absence (black dashed line) and presence of 5% (w/v) ROO 1 (red line) using ITO electrode. Scan rate, 0.1 V/s.

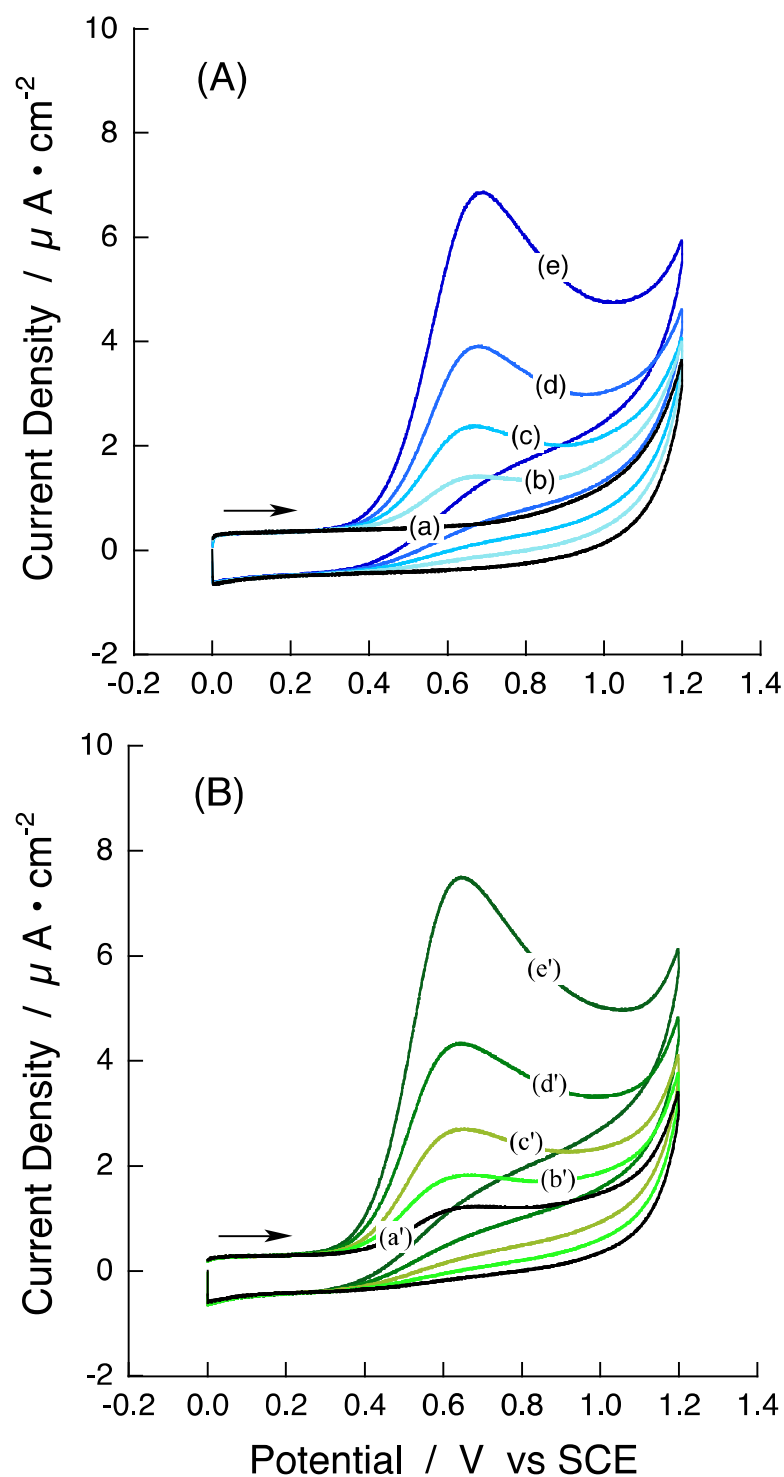


Figure 3-6. $\square\square\square\square$ BME solutions with 5 % (w/v) GTO (A) and 5 % (w/v) ROO **1** (B) in absence (a and a') and presence of α -tocopherol at 10.8 (b and b'), 21.6 (c and c'), 43.2 (d and d'), and 86.4 $\mu\text{g/mL}$ (e and e') using F-ECR electrode at 0.1 V/s.

BME溶液に α -tocopherolをさらに添加することで、0.69Vにおける酸化ピークは α -tocopherolの濃度の増加に応じて比例的に増加した。BME-EC法における特筆すべき点は、CV測定における酸化ピークの前に現れる0.0–0.3 Vの電気二重層の領域での極めて高い再現性が見られ、電極への汚れに対するBME-ECシステムの強靱性を示している。

Figure 3-7 (A)にFigure 3-6で得られた0.69 VでのGTOならびにROO中の α -tocopherolの濃度に対する α -tocopherolの酸化ピーク電流との相関を示す。すべての酸化ピーク電流は、 α -tocopherolの濃度に比例し、高い相関係数 (>0.996)となった。 α -tocopherolを溶解したBME溶液は、酸化ピーク電流と添加した α -tocopherolの濃度間でよりシンプルな相関関係となり、その直線は原点を通過した。モデルオイルであるGTOの場合、 α -tocopherolの酸化ピーク電流は、oil中の α -tocopherolの濃度の増加に伴い直線的に増加し、その直線は原点を通過した。しかしながら、GTOでの α -tocopherolの濃度に対するピークの傾きは、 α -tocopherolのみを添加したBME溶液での値と比べおよそ半分の値となった。BME溶液中において、酸化還元反応は一般に、電気活性種の単純な拡散によって支配されている⁶⁷。それゆえ、傾きの減少は、粘度の増加のためBME中の α -tocopherolの拡散係数の低下によるものと推察される。BME溶液中のGTOの含有量を低下させるとピーク電流の傾きは増加するという事実は容易に説明される。興味深いことにROO 1のBME溶液は、基本的に同様の α -tocopherolの濃度に対するピーク電流の傾きで、 α -tocopherolのピーク電流の線形の相関を示すとともに確かな y切片を有する。傾きの良い一致は、GTO ならびに ROO 1のBME溶液の間に、ほとんど同じ拡散係数であることを意味していると考えられる。ROOのBME溶液による y切片は、ROO 1中に自然に含まれている α -tocopherolの存在を示している。Figure 3-7 (A)の y切片から推定したROO 1中の α -tocopherolの濃度は、215 mg/kgであり、SFCによる分析によって測定された203 mg/kgの値と良い一致を示した。

Figure 3-7 (B)に0.69 VでのGTOならびにROO 1のオイルサンプル中の α -tocopherolの濃度に対する電気量 Q の線形の相関を示す。Figure 3-7 (B)での0 ~ 1.2 V の電流を積分した電気量 $Q_{0-1.2V}$ は、ピーク電流と濃度間との関係同様、 α -tocopherolの濃度に比例し、高い相関係数(>0.996)となった。BMEシステムでのFigure 3-7Bにおけるピーク電流の傾きの関係は、Figure 3-7 (A)中での $Q_{0-1.2V}$ のそれと基本的に同じである。しかしながら、y切片から明白な固有の α -tocopherol濃度が推定されたが、ピーク電流からの推定よりおおよそ1.5倍、高い値となった。このことは、ROO 1の中にも α -tocopherol以外の抗酸化物質を含んでいることによるものと考えられる。

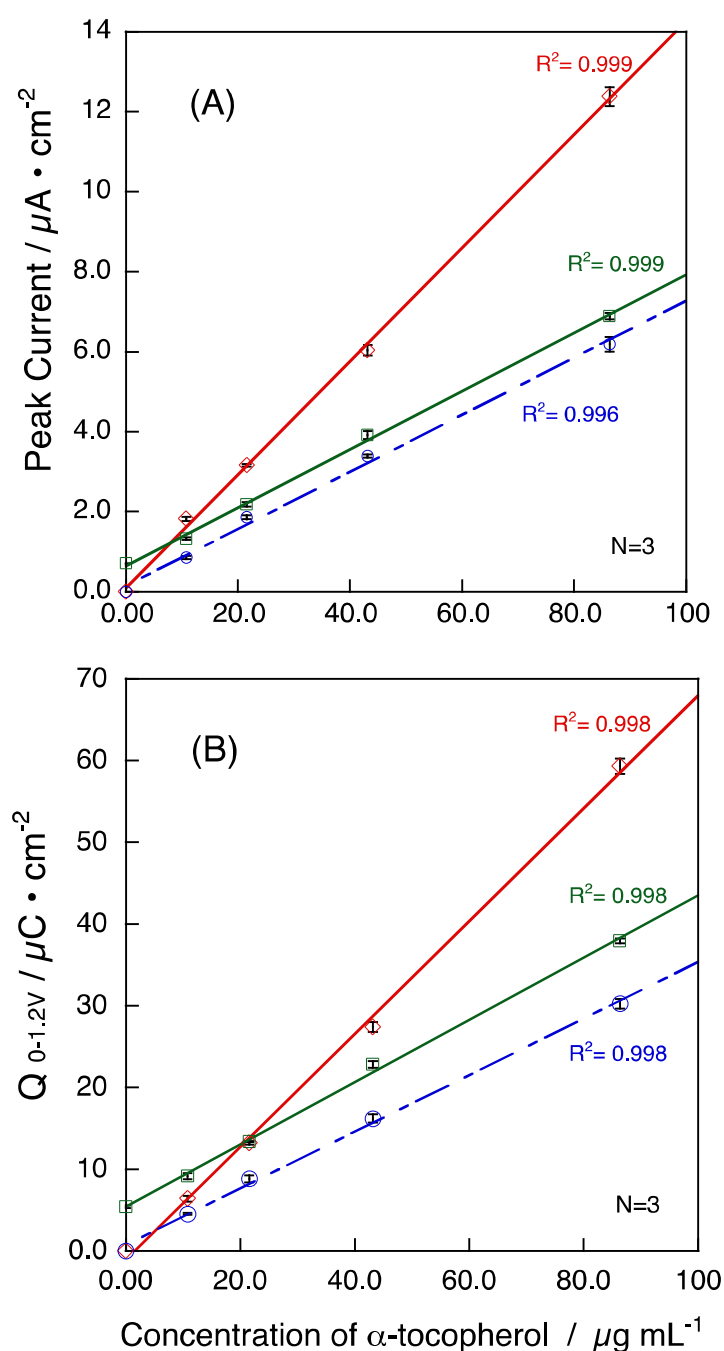


Figure 3-7. Plots of peak currents of α -tocopherol at 0.69 V in CVs for BME solutions (red line with diamonds) with 5 % (w/v) in oil samples of GTO (blue dashed line with circles) and ROO **1** (green line with squares, A) and $Q_{0-1.2\text{V}}$, integrated from currents from 0 to 1.2 V (B) against α -tocopherol content in oil samples. CVs measured in BME solution using F-ECR electrode at 0.1 V/s, corresponding to CVs in Figure 3-6. Each plot measured three times and average values with error bars shown.

3-5 BME—EC 法によるオリーブオイルの抗酸化能の評価

Olive oilをBME溶液に加え、olive oilサンプル 1 – 5の定量分析を行った。BME溶液にolive oil 1 – 5を5 % (w/v) 加えた時のCVをFigure 3-8 (A) に示す。通常 α -tocopherolの酸化による0.69 Vの酸化ピークは、すべてのolive oilサンプル(1 – 5)で観測された。さらに、ROO 1を除くサンプル2 – 5で、0.96 Vに酸化ピークも観察され、特にEVOOs 3 – 5では非常に高い電流応答が得られた。0.96 Vの帰属はまだわかっていない。その上、サンプル 2 – 5において1.0 V付近に酸化電流の増加が見られた。1.0 V付近の電流は、olive oil中の抗酸化物質の一つであるtyrosolによるものと考えられる。BME中でのtyrosolのCVは、Figure 3-8 (B) に示すように0.5Vから電流が流れ始めるブロードの酸化ピークが確かに得られた。実際のところ、サンプル 2 – 5でCVの酸化電流によって見積もられる α -tocopherolの濃度は、SFCで得られた値よりも数倍高い値となった。シンプルなBME—EC法により、モデルオイルであるGTO や ROO 1の α -tocopherolの濃度は分析できているが、しかしながら他のolive oilの場合、 α -tocopherol以外の他の抗酸化物質を含み、tyrosolのような他の抗酸化物質の酸化電流が重なるため、 α -tocopherolや他の抗酸化物質の濃度をそれぞれ分析することは困難となる。Table 3-1に示すようにtyrosolは、ROO 1に含まれていない。

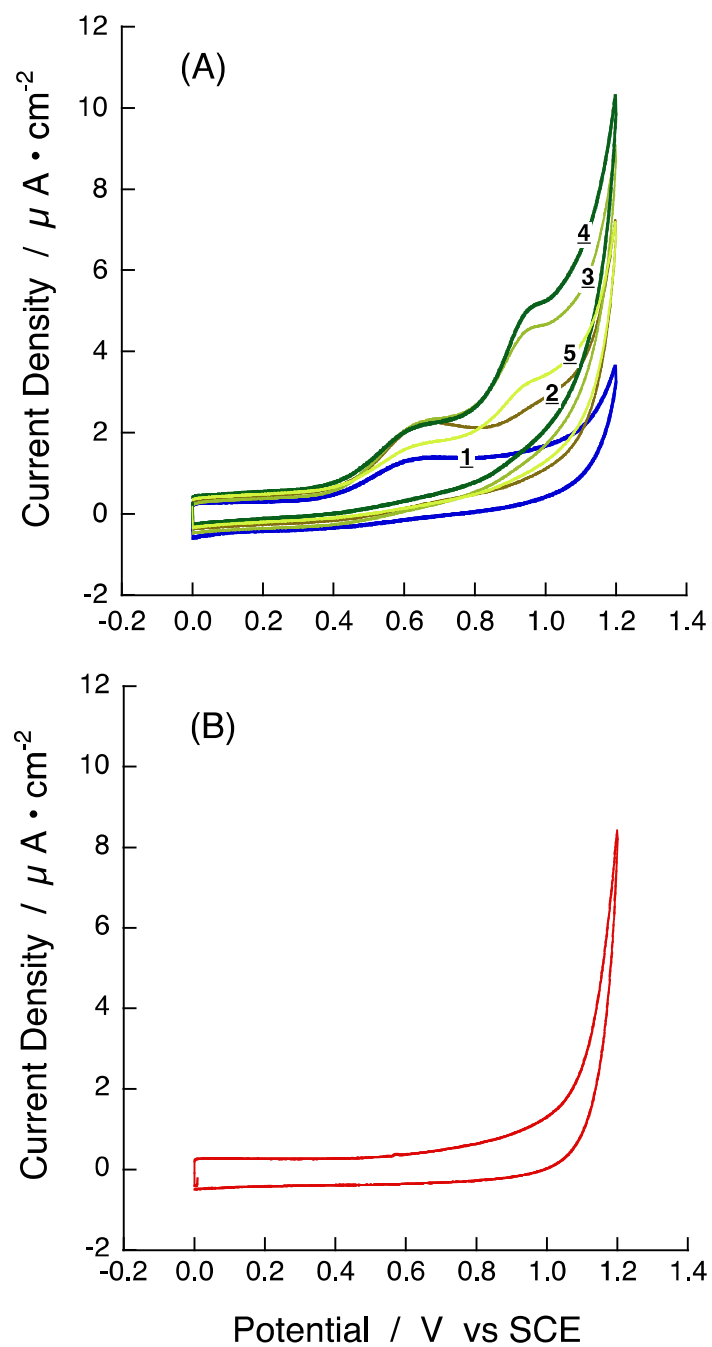


Figure 3-8. CVs (A) of BME solutions in presence of 5 % (w/v) olive oils, showing ROO 1, R-VOO 2, and EVOOs 3–5, and CV (B) of BME solution in 0.1 mM tyrosol using F-ECR electrode at 0.1 V/s.

それぞれの物質の定性ならびに定量分析は困難であるにもかかわらず、実際のolive oil中の抗酸化物質の定量的評価は、食品分析において非常に重要である。Olive oilの抗酸化力として、それぞれのCVで酸化電流の積算によって得られる電気量 $Q_{0-1.2V}$ とolive oilの総ポリフェノール量ならびにORAC値とを比較した。Q値は、抗酸化活性を測定する際に、ピーク電流よりも有利である。Figure 3-9にolive oilサンプル1 – 5について、BME中で電気化学的に測定した $Q_{0-1.2V}$ と総ポリフェノール量、ORAC値の関係を示す。抗酸化活性を示す、総ポリフェノール量、ORAC値は、それぞれgallic acid とTroloxの当量濃度を表している。 $Q_{0-1.2V}$ 値は、総ポリフェノール量ならびにORAC値の両方に良い相関を示した。回帰直線によって示された相関係数 R^2 は、それぞれ0.935ならびに0.962であった。3つの測定方法で一致したので、EVOO 3 – 5は、ROO 1ならびにR-VOO 2よりむしろ高い抗酸化活性であることを明らかにした。BME-EC法は、濃度が既知の抗酸化物質だけでなく、oilの抗酸化活性の評価を可能にし、従来法による抗酸化活性と一致した。さらに、総ポリフェノールならびにORAC測定は、基本的に分析の前に溶媒による抽出プロセスが必要とされる。総ポリフェノールならびにORAC測定は、methanolによる抽出操作を含んでおり、Ninfaliら⁵³は、olive oil中の幾つかの抗酸化物質の低溶解性の問題について言及している。BME-EC法はoilの分析で抽出する必要がないため、抗酸化物質の溶解性の問題に対する抽出溶媒の選択や方法などの問題を解決するとともに、オイル中の抗酸化物質を評価法として、従来法を越える簡便かつ迅速な測定方法であることを明らかにした。

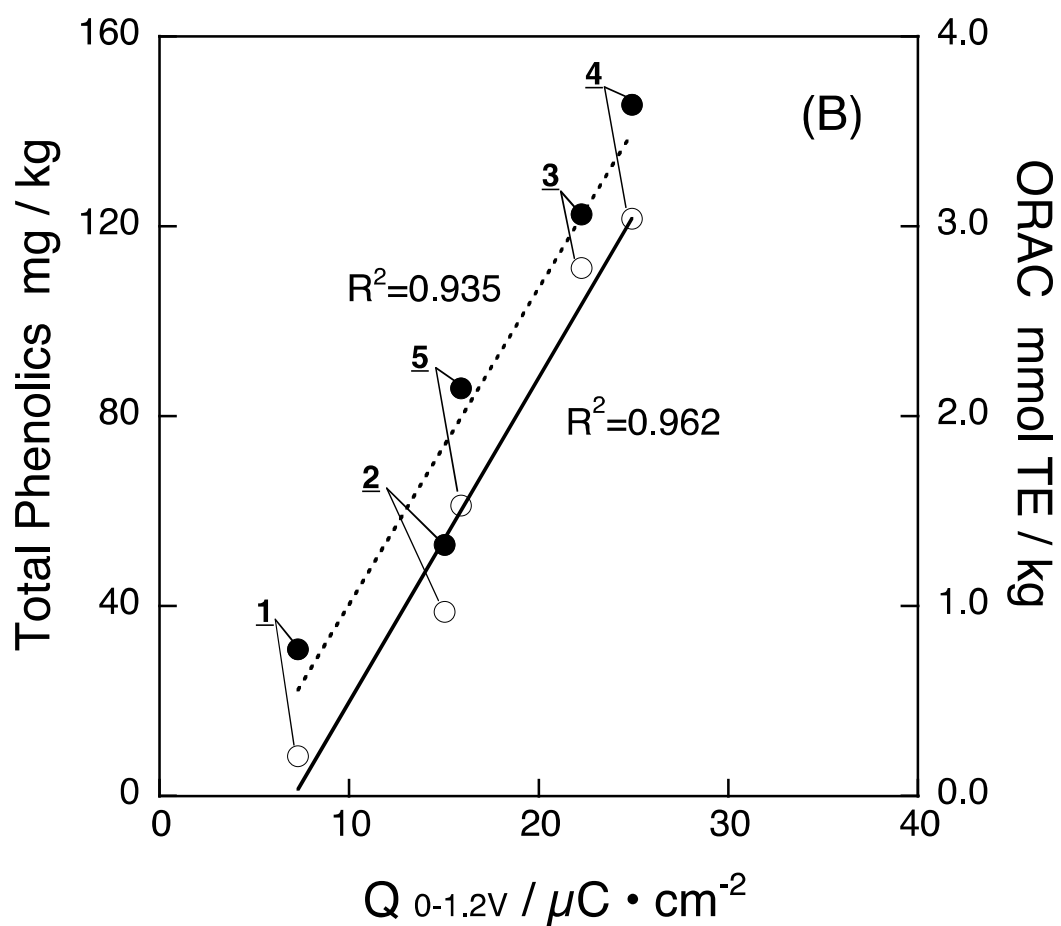


Figure 3-9. Correlations of total phenolics content (solid circle, dotted line) and ORAC values (open circle, solid line) against $Q_{0-1.2V}$ values for olive oil samples 1–5. $Q_{0-1.2V}$ values obtained from corresponding CVs in Figure 3-8A.

3-6 結 語

本章では、BME-EC 法を用いて olive oil の抗酸化活性を評価し、BME 溶液中における olive oil の電気化学的な特性を調査した。本研究で提案した BME-EC 法と総ポリフェノール量の測定や ORAC 分析の比較を行い、olive oil 中の抗酸化物質の評価を行い、トータルの抗酸化活性の直接分析が可能か検討を行った。

その結果、olive oil 中の抗酸化物質の定量分析において、BME-EC 法の高い適用性ならびに信頼性を明確に示した。提案した BME-EC 法は、olive oil 中の抗酸化物質の分析において、従来の分析法に匹敵する信頼できる良い結果を示した。この方法は、抽出操作が不要で画期的であり、簡単、迅速、高い再現性を有する分析であり、本方法は、食用油を超える分析対象物や媒体など広い領域に適用できる可能性を示した。

第4章 BME 電気化学による植物精油（エッセンシャルオイル）の抗酸化能の評価

4-1 緒 言

植物の精油は、エッセンシャルオイルと呼ばれ、植物が産出する揮発性の油であり特有の芳香を有し、イソプレンを基本骨格とするテルペン類からなる。植物精油の歴史は古く、現在でもヨーロッパを中心に香料としての利用はもとよりその機能性から医療にも広く用いられている⁷¹。近年、エッセンシャルオイルのさらなる機能性が注目され、抗菌性⁷²、抗感染性⁷³、抗真菌性⁷⁴、抗防腐性、解熱剤⁷⁵、抗腫瘍活性^{71,73,76-78}にも注目が集まっている。

精油またはエッセンシャルオイルは、水蒸気蒸留法または直接蒸留法によって植物から留出され、一般に数百種類の化合物からなる複雑な混合物で、その芳香から主に食品産業でも香料として利用されているだけでなく、機能性抗酸化剤、抗ラジカル、抗菌剤としての利用も検討されている⁷⁹。主成分は親油性のテルペン類からなり、テルペンにヒドロキシ官能基が付いたテルペノイド類が抗酸化作用を持つ。また、合成抗酸化物質のような有害である保存料に比べ、天然の抗酸化物質を多く含むことからエッセンシャルオイル中の抗酸化活性評価が現在求められている。

植物精油の機能性探索には、DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) フリーラジカルによる抗酸化能の測定（DPPH 法）が一般に行われているが、カイネティックな反応¹⁸であるために、反応時間はもとより酸化体／還元体比、溶媒の種類、含水量や pH、遷移金属イオンの影響など大きく受けて測定条件や測定者により抗酸化能が大きく異なるなど問題も多い²¹。さらに DPPH 法は、エタノールを溶媒として測定するため、エタノールに溶解しないあるいは溶解するものの白濁してしまうエッセンシャルオイルなどは測定が困難である。グラッシーカーボン電極を用いた電気化学的なアンペロメトリック法による DPPH フリーラジカルを用いた抗酸化活性の研究⁸⁰もあるが、いずれにせよ精油のような親油性化合物の抗酸化能分析は、水溶液中での酸化還元機構と大きく異なるために困難を極める。

第2章では、特異的な反応場として界面活性剤によって生成する両連続相マイクロエマルジョンに注目し、親油性の高い化合物と親水性の高い化合物の両者を同時に溶

解した溶液中で、電気化学的な手法によりそれぞれの酸化還元力を分離して測定することを試みた。その結果、モデル物質である ascorbic acid や gallic acid、Trolox、 α -tocopherol などの還元力を、電極の選択により同時にあるいは別々に測定できることを示した。特に両連続相マイクロエマルジョンを用いた抗酸化能測定では、含水量や pH 共存、一定条件下において α -tocopherol のような親油性化合物の抗酸化能のみを測定することも示した。さらに第 3 章では、olive oil のような油も BME の溶解させることにより、olive oil に含まれる抗酸化物質を検出でき、抗酸化能を評価できることを示した。そこで本章では、両連続相マイクロエマルジョン BME の特異的な反応場を応用し、エッセンシャルオイルの新たな抗酸化能評価方法について検討を行った。一般に市販されているエッセンシャルオイルについて BME-EC 法により抗酸化能の評価を行った。さらにこれまで困難であったエッセンシャルオイル中の親油性、親水性抗酸化物質をそれぞれ個別に測定し、新たな抗酸化能評価を行った。

4-2 実 験

4-2-1 試 薬

本章では第2章で述べたBMEを使用したため、BME作成に必要な試薬は割愛する。また、CV測定で用いた器具・装置も第2章と同じものを用いたため割愛する。本章において、使用した試薬をTable 4-1に示す。試薬は、いずれも特級以上のグレードを使用し、溶液の調整には全て超純水を使用した。本章では、抗酸化能の比較対象とする抗酸化物質として、没食子酸 (gallic acid)を、両親媒性抗酸化物質には Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)を、親油性抗酸化物質には α -トコフェロール (α -tocopherol)を用いた。さらに、エッセンシャルオイルの抗酸化能を評価するのにしばしば使用されるブチルヒドロキシアニソール (2-*tert*-butyl-4-methoxyphenol, BHA)、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT, 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol)についても検討を行った。また、本章で使用した比較対象とする抗酸化物質それぞれの抗酸化物質の構造式をFigure 4-1に示す。

Table 4-1. Materials

Materials	Product source
Ethanol 99.5%	Nacalai Tesque Co.
Gallic acid	Nacalai Tesque Co.
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)	TCI Co.
α -Tocopherol	Nacalai Tesque Co.
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Wako Co.
2- <i>tert</i> -Butyl-4- methoxyphenol (BHA)	Sigma-Aldrich Co.
2,6-Di- <i>tert</i> -butyl- <i>p</i> -cresol (BHT)	Sigma-Aldrich Co.

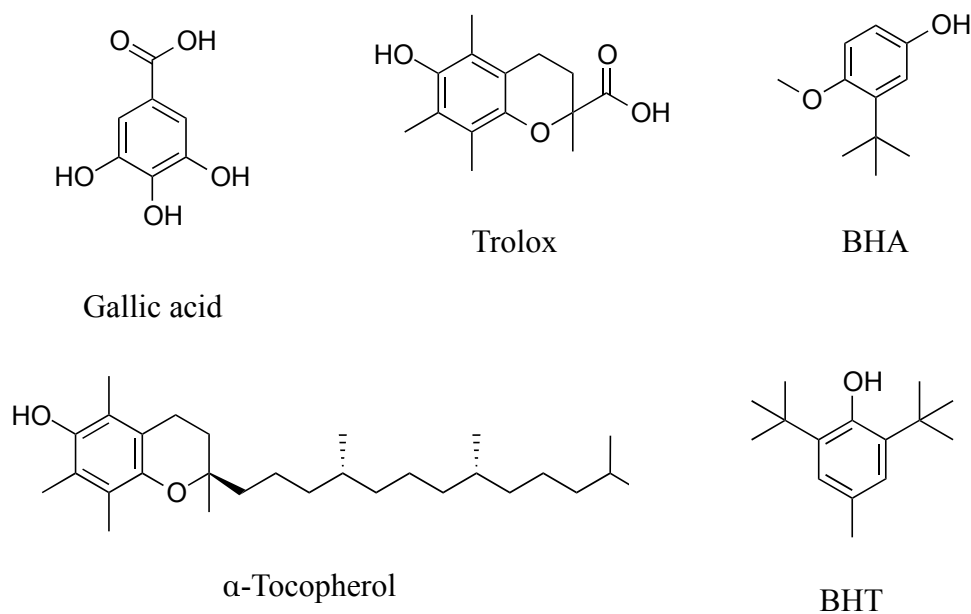


Figure 4-1. エッセンシャルオイルの評価に使用した抗酸化物質の構造式

4-2-2 エッセンシャルオイルのサンプル

本章で使用したエッセンシャルオイルのサンプルを以下の Table 4-2 に示した。S1～S13 のエッセンシャルオイルは、市販されているものを購入して使用した。S14 ベチバーのエッセンシャルオイルは、沖縄県国頭郡本部町で栽培されたベチバー (*Vetiveria zizanioides*, Vetiver) より根を収穫し、水分量 10% 程度まで乾燥したものを沖縄工業高等専門学校にて水蒸気蒸留を行い、得られた精油を試験に供した。

Table 4-2. 本章で使⽤したエッセンシャルオイルのサンプル

No.	エッセンシャルオイル	科	抽出部位	Source
S1	ゼラニウム	フクロソウ科	全草	株式会社 生活の木
S2	ティートリー	フトモモ科	葉	(株)インセント
S3	パイン	マツ科	球果	株式会社 生活の木
S4	パイン	マツ科	葉・枝	ガイア・エヌピー(株)
S5	パチュリ	シソ科	葉	株式会社 生活の木
S6	ヒノキ	ヒノキ科	木部	株式会社 生活の木
S7	ヒバ	ヒノキ科	木部	株式会社 生活の木
S8	フェンネル・スイート	セリ科	種子	ガイア・エヌピー(株)
S9	ベチバー	イネ科	根	株式会社 生活の木
S10	ペパーミント	シソ科	葉・花	株式会社 良品計画
S11	柚子(水蒸気蒸留法)	ミカン科	果皮	株式会社 生活の木
S12	ローズウッド・葉	クスノキ科	葉	株式会社 生活の木
S13	ローズウッド	クスノキ科	木部	株式会社 生活の木
S14	ベチバー	イネ科	根	沖縄高専

4-3 DPPH フリーラジカル捕捉能によるエッセンシャルオイルの抗酸化能の評価

活性酸素とは、酸素分子 ($^3\text{O}_2$)が電氣的刺激や紫外線によって、より反応性の高い化合物へと変化したものの総称である。一般には、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル (HO^\cdot)が挙げられる。フリーラジカルとは不対電子を持つ原子／分子であり、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシラジカル (HO^\cdot)等の他に、脂質ラジカル (L^\cdot)、脂質ペルオキシラジカル (LOO^\cdot)等が挙げられる。エッセンシャルオイルには、これらの活性酸素生成の抑制や、フリーラジカル消去能に優れた成分を含むものも多く、エッセンシャルオイルの機能性の評価の一つとして、非常に重要である。

エッセンシャルオイルの抗酸化能の評価方法は、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Figure 4-2)を用いた吸光光度法により、ラジカル消去能を評価する。DPPH ラジカルは溶媒に溶かすと紫色を呈し、520 nm 付近に吸収を持つが、抗酸化物質との反応により DPPH ラジカルが消去されると紫色が薄くなる。これは、フリーラジカルである DPPH の窒素上のラジカルが、水素原子や他のラジカルが付加することによって消去され、520 nm の吸光度の減少量を Trolox や α -tocopherol、BHA などを標準物質とした当量濃度として求める測定法である (Figure 4-3)。

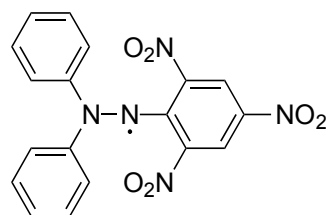


Figure 4-2. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)の構造式

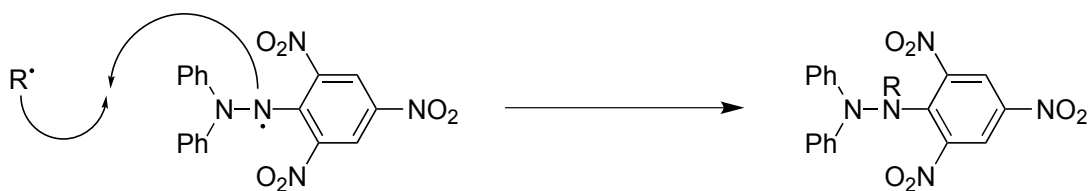


Figure 4-3. DPPH ラジカルの構造式ならびに DPPH ラジカルによるラジカル R[·]の反応

また、DPPH ラジカル消去能による抗酸化能のもう一つの評価方法として IC₅₀ 値がある。これは、試料を添加しないブランクの吸光度を 100 %とした場合に、50 %の消去濃度が得られる試料濃度を求める方法である。DPPH ラジカルの阻害率 (%)を次式に示す。

$$\text{DPPH scavenging effects (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \quad (4-1)$$

ここで、A₀ ならびに A₁は、それぞれ測定対象となる抗酸化物質を添加、未添加のときの517 nmにおけるDPPHラジカルの吸光度を示す。このときDPPHラジカルの阻害率を50%とする試料濃度 (mg/mL)が IC₅₀値となる。

4-3-1 溶液の調整ならびに抗酸化活性の測定

DPPH 法のための溶液調整ならびにエッセンシャルオイルの抗酸化活性の測定は以下の通り行った。

(1) DPPH 溶液の調製 (126.8 μMDPPH 溶液)

① DPPH 一次溶液の調製 (10 倍濃度 : 1268 μM DPPH)

DPPH 5mg に ethanol を 10mL 加え超音波処理し、一次溶液とした。

② 測定用 DPPH 溶液の調製

DPPH 一次溶液を ethanol で 10 倍希釈 (126.8 μ M DPPH) して測定に用いた。

(□) α -Tocopherol 一次標準溶液の調製 (40 mg/mL α -tocopherol)

α -Tocopherol 200 mg にエタノールを 5 mL 加え超音波処理し、1 次溶液とした。

(3) 試料溶液の調整 (20 mg/mL エッセンシャルオイル)

本章で使用したエッセンシャルオイルのサンプルをそれぞれ 100 mg メスフラスコにとり、ethanol を加え 5 mL とし、超音波処理して 1 次溶液とした。調製した試料溶液を更に 2 倍、5 倍、10 倍に希釈した。

(4) α -Tocopherol 標準物質の検量線の作成

40 mg/mL α -tocopherol 一次標準溶液を ethanol で段階的に希釈し、20～200 μ M の濃度に調製した。96 well マイクロプレート各 well に ethanol を 80 μ L ずつ加え、段階的に希釈した α -tocopherol 溶液を 20 μ L ずつ加えた。126.8 μ M DPPH 溶液を 100 μ L 加えたのち、37 $^{\circ}$ C に設定したマイクロプレートリーダー内で 30 分間静置した。その後、517 nm の吸光度で測定し、 α -tocopherol を添加していない 30 分後の吸光度 (Blank) から各標準溶液を添加した際の吸光度の差をもとめ、検量線を作成した。

(5) BHA 標準物質の検量線の作成

α -tocopherol 標準溶液と同様に BHA を ethanol で段階的に希釈し、20～200 μ M の濃度に調製した。96 well マイクロプレート各 well に ethanol を 80 μ L ずつ加え、段階的に希釈した α -tocopherol 溶液を 20 μ L ずつ加えた。126.8 μ M DPPH 溶液を 100 μ L 加えたのち、37 $^{\circ}$ C に設定したマイクロプレートリーダー内で 30 分間静置した。その後、517 nm の吸光度で測定し、BHA を添加していない 30 分後の吸光度 (Blank) から各標準溶液を添加した際の吸光度の差をもとめ、検量線を作成した。

(6) 試料溶液の抗酸化活性の測定

96 well マイクロプレートの各 well に ethanol を 80 μL ずつ加え、各濃度に調製した試料溶液を 20 μL ずつ加えた。次に、126.8 μM DPPH 溶液を 100 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ に設定したマイクロプレートリーダー内で 30 分間静置した。そして、517 nm の吸光度で測定し、吸光度の減衰量から、標準物質である α -tocopherol 相当量 ($\mu\text{mol/g}$) ならびに BHA 相当量 ($\mu\text{mol/g}$) としてエッセンシャルオイルの抗酸化能を算出した。IC₅₀ 値は、式 (4-1) より段階的に希釈したサンプルの DPPH ラジカルの阻害率から算出した。

4-3-2 DPPH フリーラジカルによる抗酸化能の評価

一般に市販されているエッセンシャルオイルについて BME-EC 法により抗酸化能の評価を行うに先立ち、DPPH 法により市販エッセンシャルオイルの抗酸化能評価を行った。通常、DPPH 法での希釈溶媒は、50 % ethanol 溶液もしくは 50 % ethanol-0.1M トリス-塩酸 Buffer (pH7.4) を使用するが、エッセンシャルオイルこれらの溶液に完全に溶解せず白濁するものも多いため、希釈溶媒には全て 99.5 % ethanol を使用した。Table 4-3 に DPPH 法を用いたエッセンシャルオイルにおける抗酸化能の結果を示す。

今回試験を行ったエッセンシャルオイルのうち最も抗酸化活性が高かったものは、サンプル S14 ベチバーで、 α -tocopherol 相当量ならびに BHA 相当量、IC₅₀ 値は、それぞれ 18.16 $\mu\text{mol/g}$ 、29.07 $\mu\text{mol/g}$ ならびに 8.69 mg/mL であった。ついで S9 ベチバー、S5 パチュリの順であった。サンプル S14 と S9 は、おなじベチバー (*Vetiveria zizanioides*) の根から得られた精油であるが、S14 ベチバーは、独自に水蒸気蒸留を行い、蒸留してすぐに測定した結果であるため、製造されて長時間経過したサンプル S9 よりも高い抗酸化活性を示したものと推察される。ベチバーには、Khusimol、 α -Vetivone、 β -Vetivone などのセスキテルペンを含有し、非常に抗酸化活性が高いことが知られて

いる^{81,82}。しかしながら、エッセンシャルオイル中の抗酸化物質も時間の経過とともに酸化され、抗酸化能に大きな差が見られたものと考えられる。

最も抗酸化活性の低かったエッセンシャルオイルは、S6 ヒノキで α -tocopherol 相当量ならびにBHA相当量、IC₅₀ 値はそれぞれ、0.19 $\mu\text{mol/g}$ 、0.20 $\mu\text{mol/g}$ ならびに 1400 mg/mL であった。S6 ヒノキでは、わずかに抗酸化活性が認められた程度であるため、IC₅₀ 値は、段階的に希釈した試料溶液の DPPH ラジカルの阻害率 (%)より算出している。そのため、溶媒に対するエッセンシャルオイルの量が非常に大きな値 (1400 mg/mL) を示し、IC₅₀ 値は、低い抗酸化活性のサンプルの評価には適切な表現とはならない。

次節では、従来法によるこれらの抗酸化活性の評価結果をもとに BME-EC 法による市販エッセンシャルオイルの抗酸化活性の評価を行った。

Table 4-3. DPPH 法によるエッセンシャルオイルの抗酸化能

No.	エッセンシャルオイル	IC ₅₀ 値 mg /mL	抗酸化能（相当量 $\mu\text{mol} / \text{g}$ ）	
			α -tocopherol	BHA
S1	ゼラニウム	474.4	0.32	0.53
S2	ティートリー	138.6	1.10	1.83
S3	パイン	680.2	0.23	0.37
S4	パイン	603.6	0.24	0.42
S5	パチュリ	45.43	3.32	5.56
S6	ヒノキ	1400	0.19	0.20
S7	ヒバ	53.03	2.99	4.76
S8	フェンネル・スイート	370.7	0.37	0.69
S9	ベチバー	19.56	7.83	12.92
S10	ペパーミント	936.8	0.17	0.27
S11	柚子(水蒸気蒸留法)	291.2	0.52	0.87
S12	ローズウッド・葉	1821	0.09	0.14
S13	ローズウッド	407.1	0.37	0.62
S14	ベチバー	8.69	18.16	29.07

4-4 BME-EC 法によるエッセンシャルオイルの抗酸化能の評価

ここでは、BME の特異的な反応場を応用しエッセンシャルオイルの新たな抗酸化能評価方法について検討を行った。一般に市販されているエッセンシャルオイルについて BME-EC 法により抗酸化能の評価を行った。さらにこれまで困難であったエッセンシャルオイル中の親油性、親水性抗酸化物質をそれぞれ個別に測定し、新たな抗酸化能評価を行った。

4-4-1 エッセンシャルオイルを含む BME 溶液の調整

抽出に使用した BME 溶液はすでに第 2 章で述べた BME 溶液と同じ組成のものを使用したため、BME 作成に必要な試薬、方法は割愛する。また、CV 測定で用いた器具・装置も第 2 章と同じものを用いたため割愛する。

エッセンシャルオイルを含む BME 溶液の調整は、あらかじめ第 2 章で述べた BME 溶液を調整し、BME の中間層を BME 溶液として取り出した。それぞれエッセンシャルオイル 10 μL に BME 溶液 990 μL を加えて 1.0 % (v/v) となるように BME 溶液に溶解し、測定対象サンプルとした。その後、CV 測定を行った。

4-4-2 BME 中での電気化学測定

電気化学測定は、それぞれのエッセンシャルオイルを BME 溶液に溶解し、作用極として親水性の ITO 電極ならびに F-ECR 電極を用いた。電極の洗浄等は、第 2 章と同様のため割愛した。電気化学測定は、電気化学測定装置（ポテンショスタット）を使用し、サイクリックボルタンメトリー (cyclic voltammetry, CV) により、BME 溶液の分析を行った。Pt 線（対極）、参照電極 (R.E.) として飽和カルメル電極 (SCE) を含めた 3 電極を BME 溶液に浸して測定を行った。また、CV の繰り返し測定による電極表面の汚染を防ぐため、実験は全て First Scan で行った。温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ (室温) で測定を行った。また、特に脱気は行わず測定を行った。電極面積は、内径 5mm ϕ の O-リングにより規制し、幾何学的な面積を電極面積とした。あらかじめ抗酸化物質の標

準として、所定の濃度の Trolox を ITO 電極ならびに F-ECR 電極にて測定し、CV の応答に基づく電気量から抗酸化活性の検量線を作成した。BME 抽出液についても ITO 電極ならびに F-ECR 電極にて同様に測定し、CV の応答に基づく電気量から抗酸化活性を求めた。

4-4-3 BME-EC 法による抗酸化能の評価

Figure 4-4 に BME 中において ITO 電極により測定した BHT の CV を示す。ITO 電極による測定では、BHT を添加しない BME 溶液ならびに 0.1 mM BHT、1 mM BHT 溶液いずれの CV において酸化ピークは、観測されずいずれの溶液の CV も完全に一致した。BHT は、BME 溶液において全てマイクロ油相に分配していることを示唆しており、マイクロ水相にのみにコンタクトしている親水性の高い ITO 電極では、BHT は検出されない。

一方、1mM BHT の BME 溶液を F-ECR 電極で測定した時のサイクリックボルタモグラム Figure 4-5 に示す。BHT は、マイクロ油相に完全に分配しているため、F-ECR 電極を使用することにより BHT の不可逆的な酸化ピークが 1.22 V に観察された。

同様に 1mM BHA の BME 溶液を F-ECR 電極で測定したところ、BHT 溶液と同様に不可逆的な酸化ピークが 0.85 V に観察された。このことから、エッセンシャルオイルの抗酸化能の評価に使用される α -tocopherol、BHT、BHA いずれも BME 溶液において F-ECR 電極により測定できることが示唆された。

α -tocopherol の濃度に対する電気量 Q の線形の相関を示す。Figure 3-5 での 0 ~ 1.2 V の電流を積分した電気量 $Q_{0-1.2V}$ は、ピーク電流と濃度間との関係同様、 α -tocopherol の濃度に比例し、高い相関係数(>0.996)となった。

Figure 4-7 に BME 中における F-ECR 電極による α -tocopherol, Trolox, BHA および BHT のそれぞれの化合物の濃度に対する電気量 Q の線形の相関を示す。0 ~ 1.2 V の酸化電流を積分した電気量 $Q_{0-1.2V}$ は、各化合物の濃度に比例し、非常に良い相関が見られた (>0.992)。 R^2 は、それぞれの化合物の検量線から求めた相関係数である。

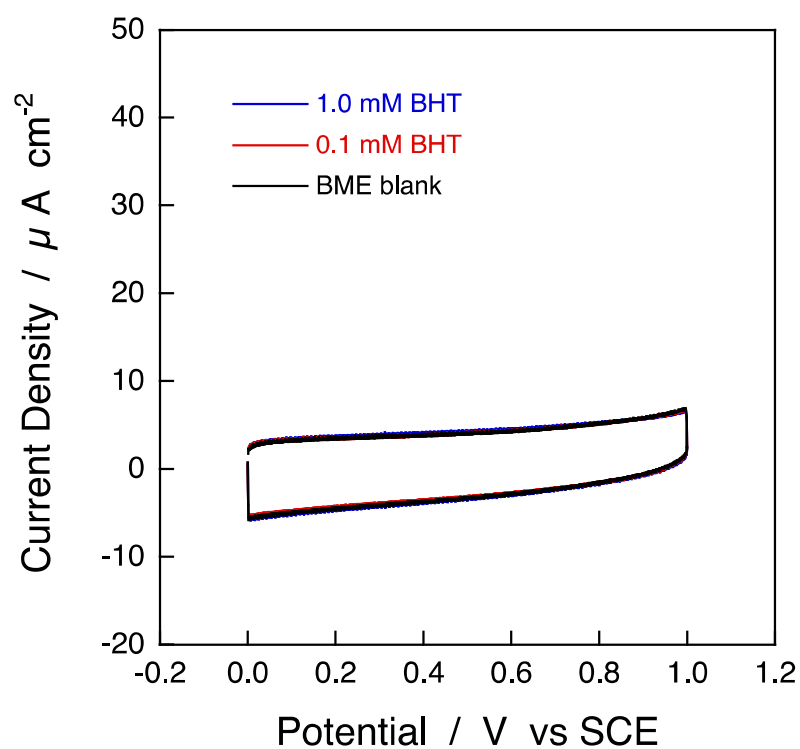


Figure 4-4. BME 中での ITO 電極による BHT を添加しない BME 溶液ならびに 0.1, 1 mM BHT のサイクリックボルタモグラム (Scan rate: 0.1 V/s)

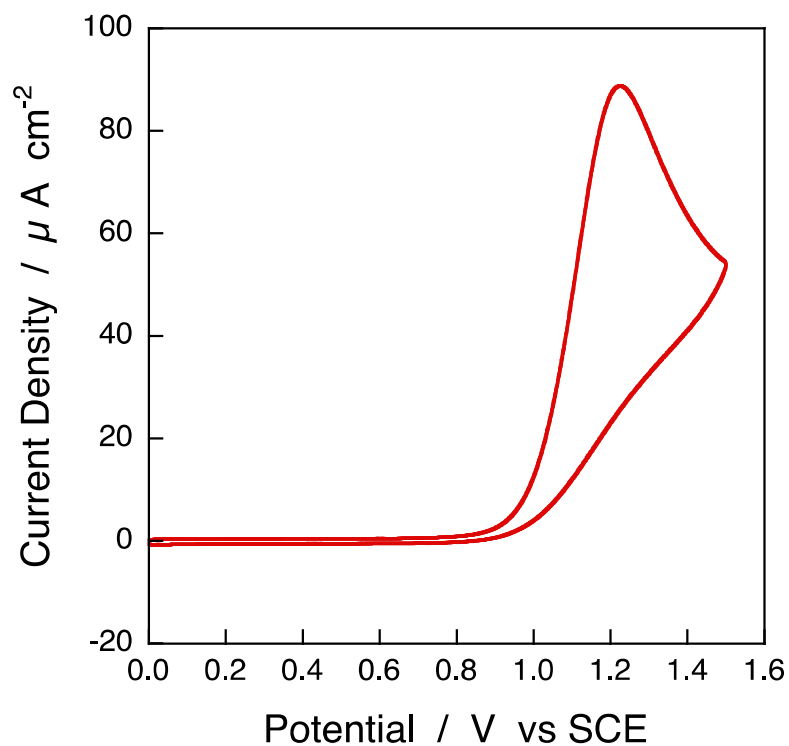


Figure 4-5. BME 中での F-ECR 電極による 1 mM BHT のサイクリックボルタモグラム (Scan rate: 0.1 V/s)

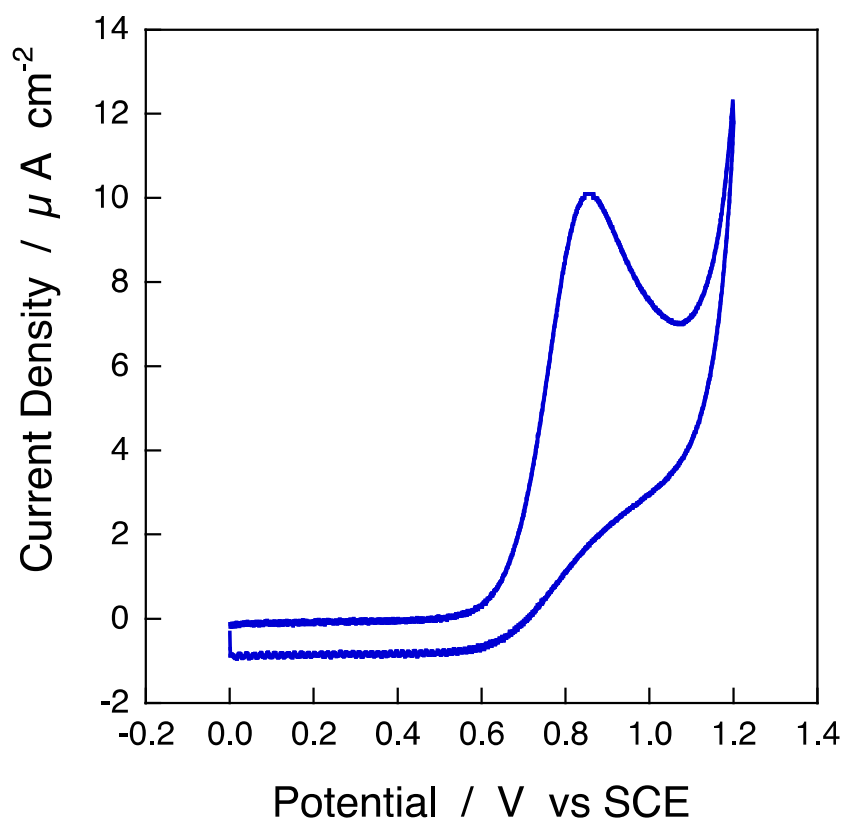


Figure 4-6. BME 中での F-ECR 電極による 1 mM BHA のサイクリックボルタモグラム
(Scan rate: 0.1 V/s)

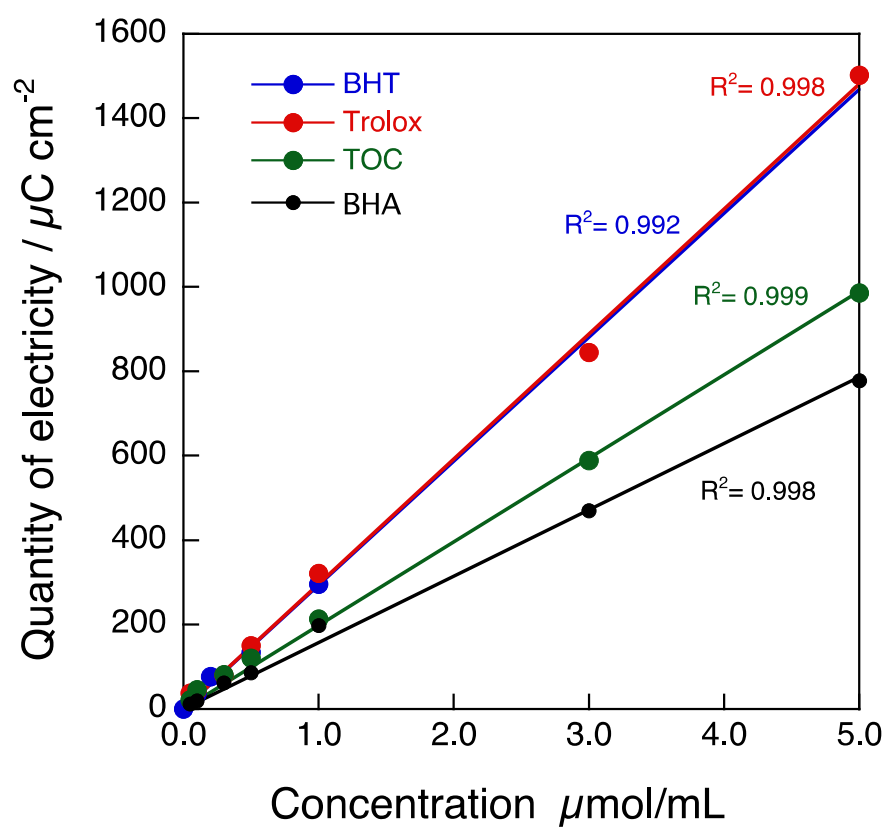


Figure 4-7. BME 中での F-ECR 電極による α -tocopherol、Trolox、BHT ならびに BHA の電気量 $Q_{0-1.2V}$ による検量線

以上の結果からも BME-EC 法によってそれぞれの化合物について直線性が高い検量線が得られており、抗酸化活性を得られた Q より α -tocopherol, Trolox, BHA および BHT の当量濃度として、エッセンシャルオイルのマイクロ油相中における抗酸化能評価が可能であることが確認できた。

Figure 4-8 (A)ならびに(B)に F-ECR 電極による 1.0 % (v/v) エッセンシャルオイルを添加した BME 中でのサイクリックボルタモグラムの示す。いずれのエッセンシャルオイルも F-ECR 電極により不可逆的な酸化ピークが観察された。しかしながらいずれの酸化ピークも 0.8 V 付近からのブロードなピークであり、特定の抗酸化物質の酸化ピークは得られなかった。14 種類のエッセンシャルオイルのうち S2 ティートリー、S7 ヒバ、S9 ベチバーならびに S14 ベチバーについて大きな酸化ピークが観察され従来までの DPPH 法による抗酸化測定と同様な傾向が見られた。Figure 4-8 (A)ならびに(B)で得られた CV より Q を求めた結果ならびに Q より Figure 4-7 の検量線より算出したエッセンシャルオイルの抗酸化能を Table 4-4 に示す。エッセンシャルオイルの抗酸化能は、 α -tocopherol, Trolox, BHA および BHT の当量濃度として示した。

BME-EC 法による抗酸化活性の測定の結果、S14 ベチバーが最も高い抗酸化活性を示し、ついで S9 ベチバー、S7 ヒバ、S2 ティートリーおよび S5 パチュリの順となった。S7 ヒバ、S3 ティートリーならびに S5 パチュリについては、DPPH 法による抗酸化活性の順序とは異なる結果が得られた。BME-EC 法は、電極表面における電子移動による直接酸化に伴う電流を測定しているため、DPPH フリーラジカルとエッセンシャルオイルとの反応機構が異なるほか、これまでに DPPH フリーラジカルと反応しない抗酸化物質の存在も指摘されている。また、BME-EC 法では、エッセンシャルオイル中のすべての物質が、マイクロ油相に分配するわけではない。DPPH 法による抗酸化活性も S7 ヒバ、S5 パチュリならびに S3 ティートリーについては、それぞれ 2.99, 3.32 および 1.10 $\mu\text{mol/g}$ と近い値を示しており、BME-EC 法でも非常に近い値を示している。マイクロ水相への分配の可能性も考えると順位の入替わりは十分に考えられる。また、BME-EC 法により S3 パインと S4 パインの抗酸化活性の違いを明確に示した。S3、S4 のエッセンシャルオイルは、同じマツから抽出したものであるが、抽出部位や製造メーカーが異なる。DPPH 法では、わずかな違いしか見られなかったが、

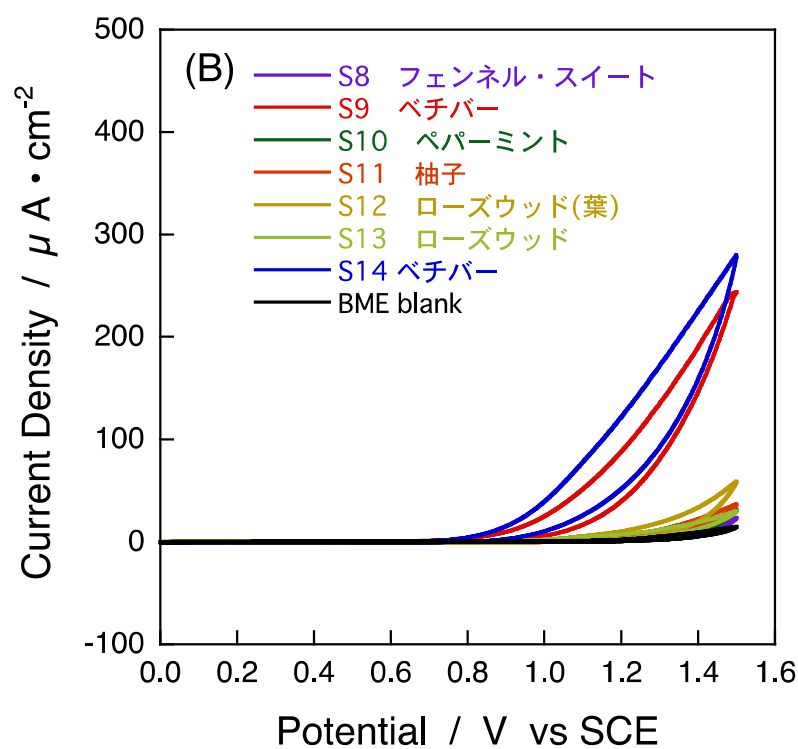
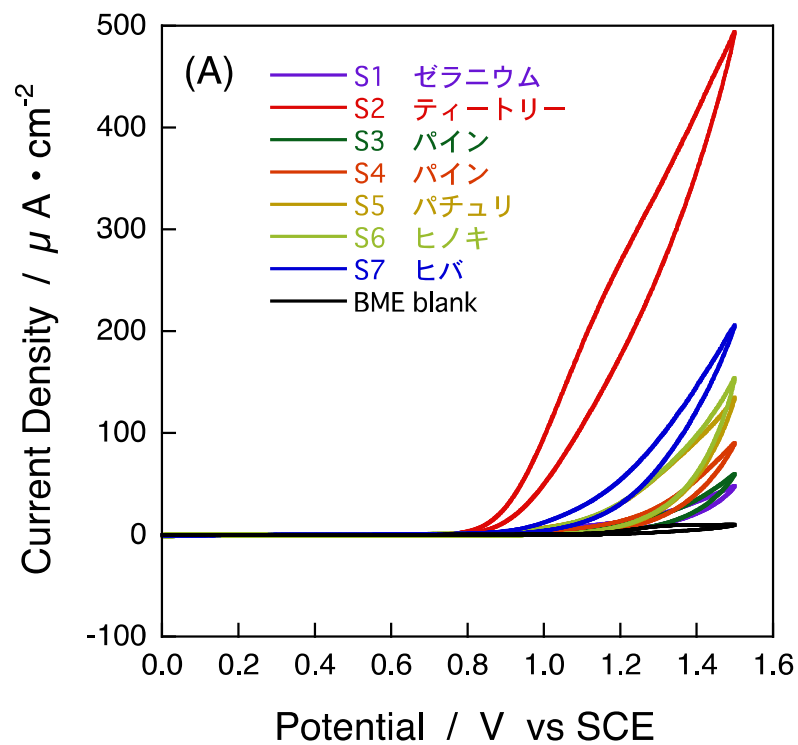


Figure 4-8. F-ECR 電極による 1.0 % (v/v) エッセンシャルオイルを添加した BME 中で
のサイクリックボルタモグラム (Scan rate: 0.1 V/s)

Table 4-4. BME-EC 法によって求めたエッセンシャルオイルの抗酸化能

No.	エッセンシャルオイル	電気量(0-1.2 V) $\mu\text{C cm}^{-2}$	各電気量(0-1.2 V)からの検量線に基づいて求めた相当する当量濃度			
			α -tocoherol $\mu\text{mol / mL}$	Trolox $\mu\text{mol TE / mL}$	BHT $\mu\text{mol / mL}$	BHA $\mu\text{mol / mL}$
S1	ゼラニウム	14.6	7.39	4.94	4.97	9.31
S2	ティートリー	32.4	16.4	10.95	11.02	20.64
S3	パイン	6.60	3.34	2.23	2.25	4.21
S4	パイン	6.80	3.44	2.30	2.32	4.34
S5	パチュリ	27.8	14.0	9.38	9.45	17.69
S6	ヒノキ	9.60	4.85	3.24	3.27	6.12
S7	ヒバ	61.4	31.0	20.74	20.88	39.10
S8	フェンネル・スイート	0.7	0.37	0.25	0.25	0.46
S9	ベチバー	118	59.8	39.96	40.23	75.34
S10	ペパーミント	1.90	0.95	0.63	0.64	1.19
S11	柚子(水蒸気蒸留法)	3.60	1.81	1.22	1.22	2.29
S12	ローズウッド・葉	12.0	6.09	4.07	4.10	7.67
S13	ローズウッド	1.50	0.74	0.49	0.50	0.93
S14	ベチバー*	156	78.7	52.59	52.95	99.16

*；沖縄県国頭郡本部町で栽培されたベチバー (*Vetiveria zizanioides*, Vetiver)より根を収穫し、水分量 10%程度まで乾燥したものを沖縄工業高等専門学校にて水蒸気蒸留

BME-EC 法により抗酸化活性の違いを明確に示し、同じ植物においても抽出部位による違いを示すことができた。

つぎに、F-ECR 電極を使用して各エッセンシャルオイルの BME-EC 法により求めた電気量 $Q_{0-1.2V}$ に対する DPPH 法より求めた抗酸化活性の当量濃度 (α -tocopherol, BHA, Table 4-3) との関係を Figure 4-9 に示す。抗酸化活性を評価したエッセンシャルオイルのうち、低い値を示したエッセンシャルオイルにばらつきは見られたものの、DPPH 法より求めた角エッセンシャルオイルの α -tocopherol ならびに BHA 当量濃度は、BME-EC 法により算出した電気量 $Q_{0-1.2V}$ と良い相関が見られた。さらに、DPPH 法より求めた IC_{50} 値 (Table 4-3) と BME-EC 法より算出した電気量 Q との相関を Figure 4-10 示す。BME-EC 法より算出した電気量 Q は、DPPH 法より求めた IC_{50} 値は、近似曲線の R^2 が 0.9434 となり、良い相関が得られた。DPPH 法により IC_{50} 値を求めるには、サンプルを段階的に希釈し、それぞれの吸光度の変化から求める必要がある。いっぽう、BME-EC 法による抗酸化能の測定は、DPPH 法よりもダイナミックレンジが広く、BME に対し 1 % (v/v) の溶液で、8 ~ 100 mg/ml の IC_{50} 値を一度の測定で求めることができる。さらに高い抗酸化活性の試料にでは、より低濃度でも測定できることを示しており、測定の感度、ダイナミックレンジに加え、測定の迅速性、簡便性は、従来の DPPH よりも格段に優れていると言える。

以上の結果から、F-ECR 電極を使用して BME-EC 法によりエッセンシャルオイルの抗酸化活性を測定できることを明らかにした。F-ECR 電極表面での酸化反応は、シンプルな拡散律速であり、また、BME にはミクロ水相も共存しているため、従来の DPPH 法で問題となる酸化体／還元体比、溶媒の種類、含水量や pH、遷移金属イオンの影響などの影響をほとんど受けず、溶媒に溶解しないあるいは溶解するものの白濁してしまうようなエッセンシャルオイルも測定可能である。第 2 章で示したように、電極表面の簡単な洗浄により再現性の良いデータが得られ、BME 溶液に 1 % 添加するだけで測定可能であることから、十分実用に耐えうる抗酸化活性評価法であると考えられる。

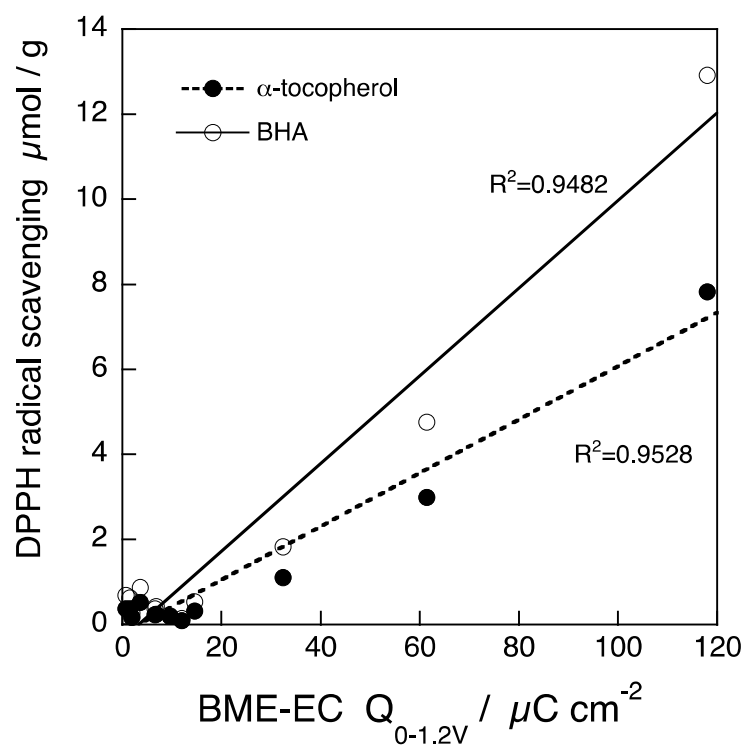


Figure 4-9. 各エッセンシャルオイルの BME-EC 法 (F-ECR 電極) により求めた $Q_{0-1.2V}$ に対する DPPH 法による抗酸化活性の α -tocopherol, BHA 当量濃度との相関プロット

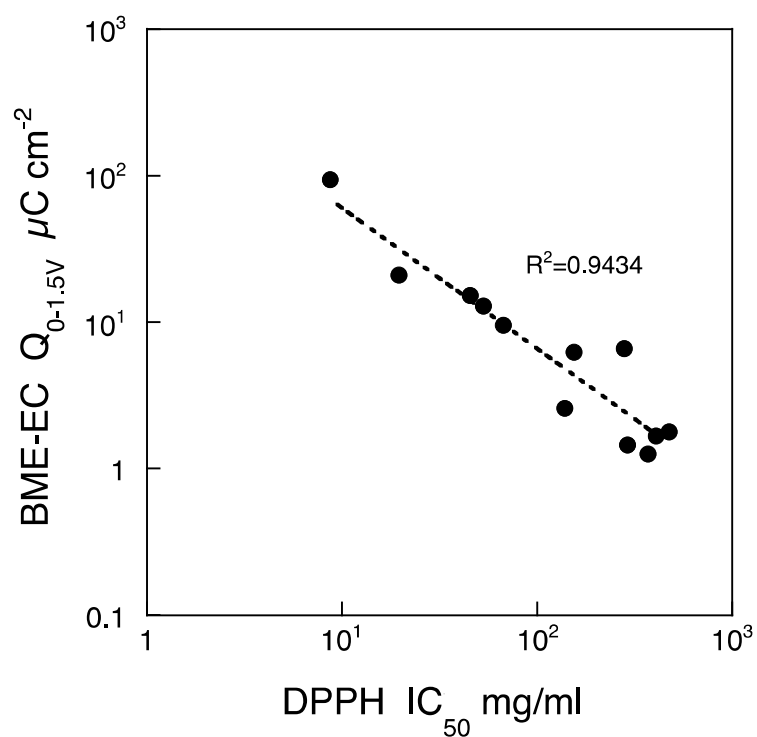


Figure 4-10. 各エッセンシャルオイルの DPPH 法による算出した IC_{50} 値と BME-EC 法による抗酸化活性との相関

マイクロ水相に分配する抗酸化物質の存在を確認するために、エッセンシャルオイルを溶解した BME 溶液の ITO 電極による BME-EC 法に基づく抗酸化活性の評価を行った。ITO 電極による電気化学測定を行うにあたり、Trolox を標準物質として 0-1.0 V の範囲で電気量による検量線を作成した。Figure 4-4 に BME 中において ITO 電極により測定した各濃度の Trolox の電気量 Q と Trolox 濃度の相関を示す。Trolox 濃度と BME-EC 法による電気量 Q は、良い相関関係にあり(相関係数 $R^2=0.998$)、直線性の高い検量線が得られたことから Trolox 相当量でエッセンシャルオイルのマイクロ水相中における抗酸化能の評価が可能であることが確認できた。

Figure 4-12 に ITO 電極による 1.0 % (v/v) エッセンシャルオイルを添加した BME 中のサイクリックボルタモグラムを示す。BME のみの溶液と比較してほとんどのエッセンシャルオイルの応答は低く、抗酸化物質の大部分がマイクロ油相に分配していることが示唆された。S10 ペパーミント、S7 ヒバの CV では、比較的大きな酸化ピークが検出され両親媒性の抗酸化物質が含まれていることが示唆された。また、F-ECR 電極による BME-EC 法での評価で高い抗酸化活性の得られた S14 ベチバー、S5 パチュリにも ITO 電極による酸化ピークがわずかに見られ、S6 ヒノキでも両親媒性の抗酸化物質が確認された。F-ECR 電極による BME-EC 法での抗酸化の評価では、S3 ティートリーと S5 パチュリの抗酸化活性が、DPPH 法によるものと順序が入れ替わる現象が見られたが、S5 パチュリの ITO 電極による測定において酸化ピークが確認されたことから、精油中の抗酸化物質の一部がマイクロ水相に分配したことで、見かけ上、親油性の抗酸化活性が低下したために起こったものと推察された。

Table 4-5 に BME-マイクロ水相中におけるエッセンシャルオイルの抗酸化能の結果を示す。F-ECR 電極で測定した時のような高い抗酸化活性を示してはいないが、S10 ペパーミント、S7 ヒバ、S14 ベチバー、S5 パチュリ、S6 ヒノキ、S11 柚子で両親媒性の抗酸化物質が確認された。それ以外のエッセンシャルオイルでは、電気量 Q は、 $1 \mu\text{C cm}^{-2}$ 以下となり、抗酸化物質の大部分がマイクロ油相に分配していることが明らかとなった。Figure 4-13 に各エッセンシャルオイルの BME-EC 法 (ITO 電極) により求めた $Q_{0-1.0\text{V}}$ に対する DPPH 法による抗酸化活性の Trolox 当量濃度との相関プロットを示す。ITO 電極での BME-EC 法による抗酸化活性は、従来の DPPH 法による抗酸化

活性とは全く相関がないことが明らかとなった。エッセンシャルオイルの抗酸化物質は、F-ECR 電極で測定した抗酸化活性と従来法との良い相関が得られたことからそのほとんどが親油性であり、マイクロ油相に分配していることが推察される。そのため、マイクロ水相に分配する両親媒性の抗酸化物質を含有するエッセンシャルオイルは、さほど多くなく、また含有量もその種類によりまちまちである。そのため、ITO 電極での BME-EC 法による抗酸化活性は、従来法と良い相関が得られなかったと考えられる。このことは、エッセンシャルオイルの抗酸化活性の評価は、F-ECR 電極による BME-EC 法で十分に評価できることを示すものである。また、ITO 電極を使用することにより、S10 ペパーミントのような、マイクロ油相中の抗酸化能よりもマイクロ水相中の抗酸化能を示す結果も得られるなど、従来の DPPH 法では明らかにできなかった親水性（両親媒性）／親油性の抗酸化活性の特徴を示すことが可能であると考えられる。

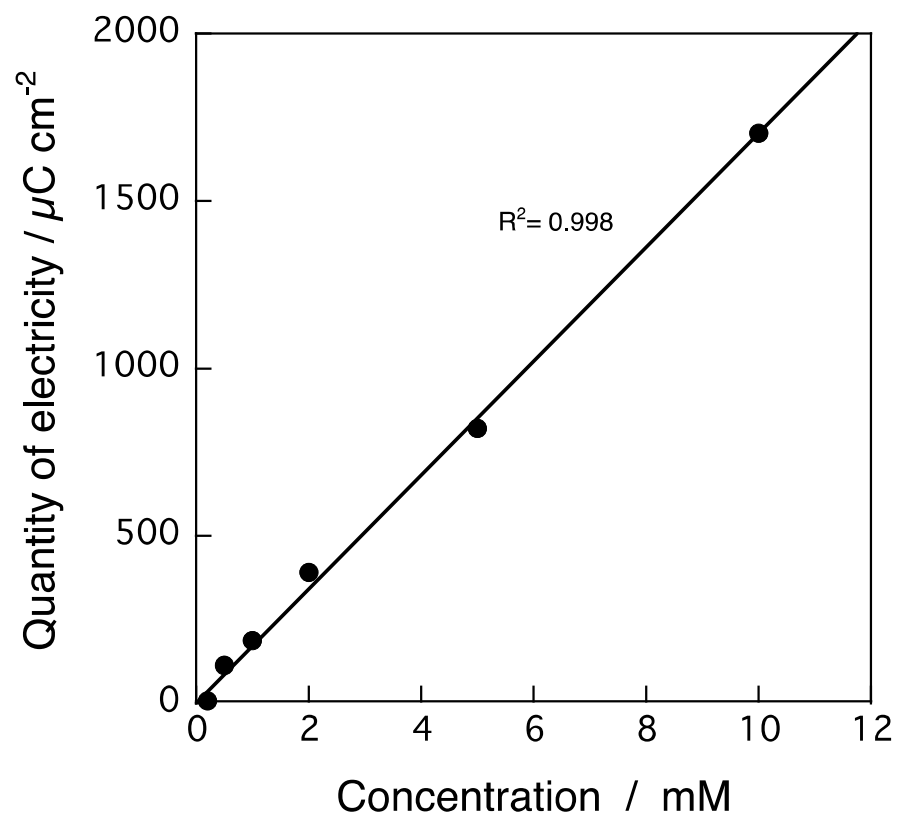


Figure 4-11. ITO 電極による BME に各濃度で添加した Trolox と電気量による検量線

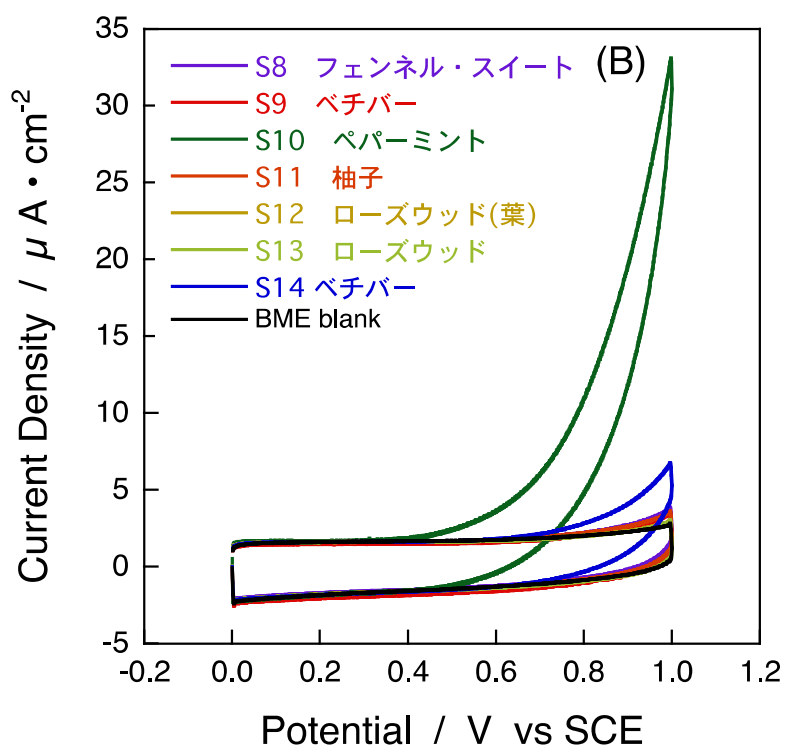
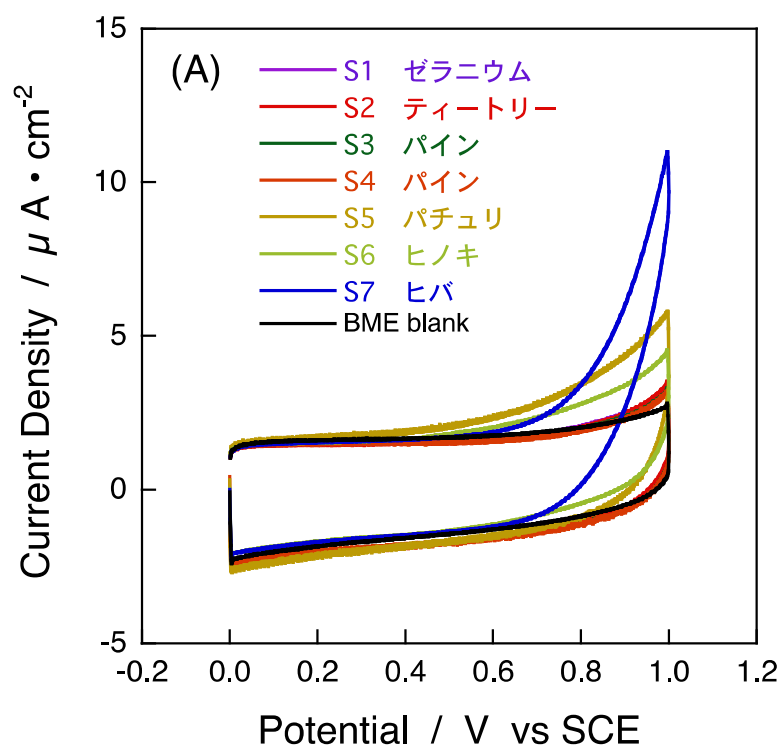


Figure 4-12. ITO 電極による 1.0 % (v/v) エッセンシャルオイルを添加した BME 中でのサイクリックボルタモグラム (Scan rate: 0.1 V/s)

Table 4-5. BME-EC 法によって求めたエッセンシャルオイルの抗酸化能

No.	エッセンシャルオイル	電気量(0-1.0 V) $\mu\text{C cm}^{-2}$	当量濃度
			Trolox $\mu\text{mol / mL}$
S1	ゼラニウム	0.44	0.26
S2	ティートリー	0.27	0.16
S3	パイン	0.37	0.22
S4	パイン	0.10	0.06
S5	パチュリ	7.48	4.40
S6	ヒノキ	3.54	2.08
S7	ヒバ	9.16	5.38
S8	フェンネル・スイート	0.61	0.36
S9	ベチバー	0.17	0.10
S10	ペパーミント	12.1	7.13
S11	柚子(水蒸気蒸留法)	1.21	1.50
S12	ローズウッド・葉	0.61	0.71
S13	ローズウッド	0.33	0.36
S14	ベチバー	5.09	0.19

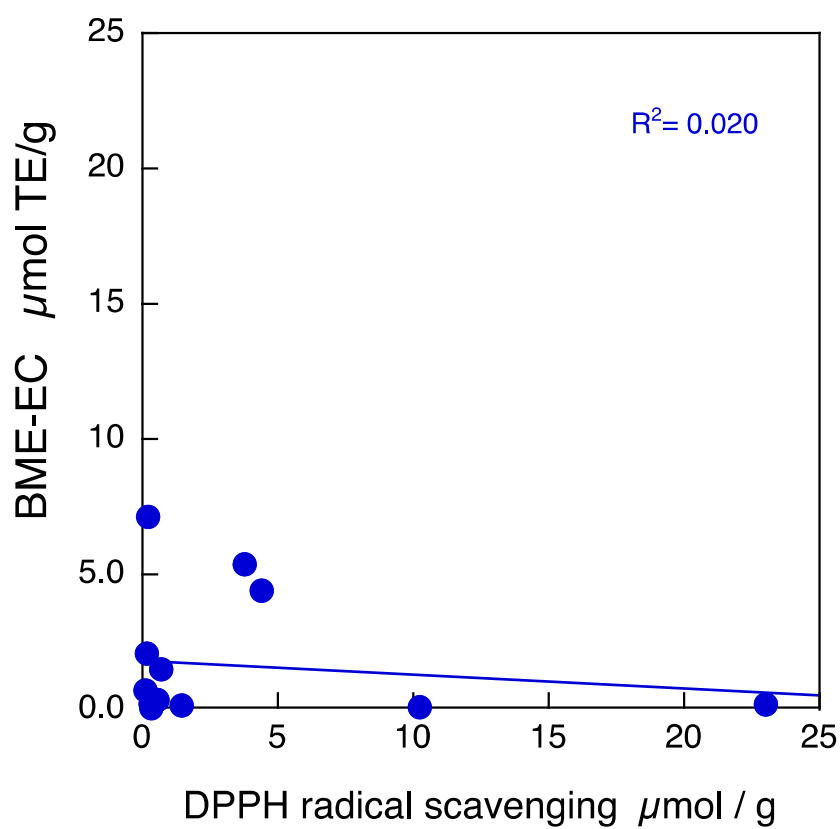


Figure 4-13. DPPH 法により求めた抗酸化活性に対する BME-EC 法(ITO 電極)より求めた抗酸化能の相関プロット

4-5 結 語

本章では、両連続相マイクロエマルジョン BME の特異的な反応場を応用し、エッセンシャルオイルの新たな抗酸化能評価法として BME-EC 法の検討を行った。エッセンシャルオイルの機能性探索には、DPPH (2,2-diphenyl- 1-picrylhydrazyl) フリーラジカルによる抗酸化能の測定—DPPH 法が一般に行われているが、カイネティックな反応であるために、反応時間はもとより酸化体／還元体比、溶媒の種類、含水量や pH、遷移金属イオンの影響など受けやすく、測定条件や測定者によるばらつきの問題が指摘されていた。本章では、一般に市販されているエッセンシャルオイルについて BME-EC 法により抗酸化能の評価を行った。エッセンシャルオイルの抗酸化能を評価する標準物質、 α -tocopherol, BHA, BHT, Trolox と BME-EC 法による酸化ピークから求めた電気量 Q と良い相関が得られた。また、BME-EC 法によって得られたエッセンシャルオイルの抗酸化活性と従来の DPPH 法とも良い相関があることを明らかにした。

さらに、ミクロ水相に分配する抗酸化物質の存在を確認するために、エッセンシャルオイルを溶解した BME 溶液の ITO 電極による BME-EC 法に基づく抗酸化活性の評価を行ったところ、いくつかのエッセンシャルオイルにミクロ水相に分配する抗酸化物質を含むものも確認できた。BME-EC 法では、エッセンシャルオイルの抗酸化能を迅速かつ簡便に測定できることに加え、従来の DPPH 法では明らかにできなかった親水性（両親媒性）／親油性の抗酸化活性もエッセンシャルオイルの新たな特徴として評価できる可能性を示した。

第5章 瞬間的高圧処理とBME溶液による直接抽出法による抗酸化能の評価

5-1 緒言

食品から抽出される機能性成分は、健康食品のみならず飲料、化粧品から医薬品まで幅広く活用される。近年では、化学合成物を使用せずに天然物から高品質で抽出・濃縮した成分を加工製品に添加することで、安全でより高い付加価値の製品開発が進められる事例も少なくない。第4章で取り上げたエッセンシャルオイルの抽出技術においても、従来までの通常の常圧下での水蒸気蒸留法に加え、減圧下で水蒸気蒸留を行うことで蒸留温度を大幅に低下させ精油の変質を抑制しながら抽出する減圧水蒸気蒸留法⁸³や、マイクロ波の加熱を利用して油胞を膨張させて破壊することで、精油を抽出するマイクロ波加熱抽出法^{84,85}、二酸化炭素による超臨界抽出法^{86,87}など様々な抽出技術が実用化している。近年、二酸化炭素による超臨界抽出による高効率な抽出技術が身近なものとなったとはいえ、食品やバイオマス試料などから機能性物質を分析評価するにあたり、その抽出方法は、依然、ミキサー等での粉碎を行ったのち溶媒によって抽出する方法が一般的に用いられる。水分量の多い試料の場合、ミキサーでは十分に破碎できないケースも多く、また乾燥試料では、粉碎過程における摩擦による発熱で抽出対象物質が酸化、変性するなど問題あり、多くの研究者、技術者が模索を続けている。

一方、両連続相マイクロエマルジョンBMEは、熱力学的に安定な親油性と親水性の溶媒間に水と油が両連続的に共存した中間層が形成される。この両連続相は、親油性の高い化合物と親水性の高い化合物の両者を同時に溶解することができるため、食品に含まれる抗酸化物質の評価における新たな反応場として検討を行ってきた。また、近年、水中衝撃波により発生する瞬間的高圧によって植物の細胞や組織に破壊作用を生じさせ、新たな高効率抽出技術の開発が進められている。本章では、水中衝撃波による瞬間的高圧処理に加え、両連続相マイクロエマルジョンBMEを抽出溶媒とし、固体からの高効率直接抽出を試み、抗酸化能評価の前処理技術としての可能性について検討を行った。

5-2 水中衝撃波による瞬間的高圧処理

衝撃波がもたらす瞬間的な高圧負荷は、植物の細胞や組織に対して独自の破壊作用を生じ、細胞内外の物質の行き来を容易にする。このため植物からの機能成分の高効率抽出が可能となる。つまり衝撃波の利用により、従来技術では残渣に残されたまま廃棄されていた有用成分を、高効率に抽出できるという特徴がある。衝撃波独自のスポーリング破壊の作用は、植物細胞の部分的破壊によって従来技術と比べて抽出効率の大幅な向上が期待される。

衝撃波は、音速を超える速度で伝播する圧力の波であり、伝播に要する時間が極めて短いことが特徴の一つである。常温では大気中で 350 m/s、水中で 1500 m/s と極めて高速であり、さらに密度が高いほど速度が速くなる特徴がある。そのため、高密度物質である植物細胞を衝撃波が伝播・通過するために要する時間は数マイクロ秒と極めて短く、圧力上昇やそれに伴う温度上昇による成分の変性・変質が生じるために十分な時間がない。すなわち、衝撃波処理による抽出は、抽出成分を変質させないにも関わらず、細胞破壊により高効率で有用成分を得ることが可能となる。

植物が生合成で生産した有用成分を利用するために抽出するためには、従来は濃縮操作としての乾燥を経て、目的物質に適した溶媒を用いた溶出や、揮発成分を蒸し上げて冷却することで抽出する水蒸気蒸留、近年では安価な炭酸ガスを溶媒とした超臨界抽出法が行われている。一方でこれらの技術は、目的成分が完全には抽出されることがなく、その多くが残渣に残存したまま廃棄されている。その他にも、用いた溶媒が残留し、目的成分が低品質となることや、長時間の加熱や加圧による目的成分の劣化など問題がある。植物細胞の部分破壊は、スポーリング破壊と呼ばれる高速破壊現象によって生じる。Figure 5-1 に示すように、物質内を超音速で伝播する圧力の波である衝撃波は、高密度から低密度への密度変化面において、下記の二つの波に分かれる。

①超音速のまま衝撃波として低密度側へ抜ける透過波

②高密度側へ反射し、音速以下の膨張波となる反射波

二つの波に分かれる際に、負圧力つまり引っ張り力による破壊作用が発生する。これがスポーリング破壊であり、衝撃波が密度変化面で引き起こす特徴的な高速破壊現象である。

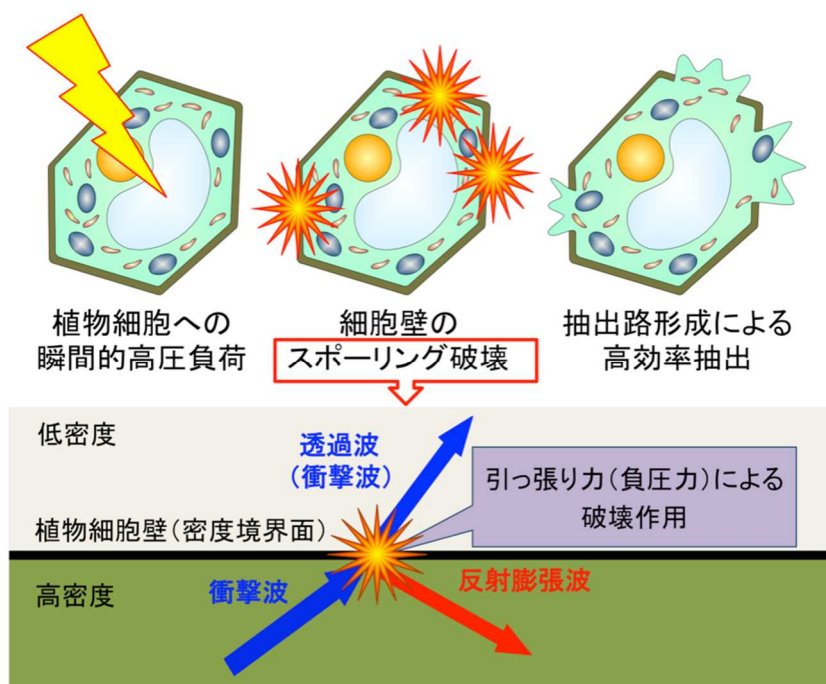


Figure 5-1. Schematic view of the spalling destruction mechanism.

衝撃波による高速破壊現象による抽出効果については、衝撃波を利用した木材の改質研究において、衝撃波が植物細胞を部分的に破壊することで細胞内外の物質の行き来を容易にし、非加熱のまま抽出効果を大幅に高められることが明らかにされている⁸⁸。また、スパーリング破壊が植物細胞内の有用成分の高効率抽出に極めて有効であることを、トマト（トマトサポニン）⁸⁹、ショウガ（ジンゲロール）⁹⁰、ヒバ（ヒノキチオール）⁹¹、イグサ（精油）⁹²、リンゴ（ポリフェノール類）⁹³などの研究でも明らかになっている。例えば、リンゴのポリフェノール類抽出効率は、衝撃波非処理の場合のおよそ5倍となる⁹³。

近年では、水中衝撃波による瞬間的高圧処理は、食品加工⁹⁴や植物精油の前処理としても有効で、沖縄地域に広く生育する月桃 (*Alpinia zerumbet*)の精油抽出において、月桃葉に水中衝撃波による瞬間的高圧処理を行うことで細胞壁に亀裂を生じさせ、精油成分の抽出経路が確保されることにより未処理に比べ1.5～2.8倍の精油収量が得られるなど、新たな可能性についてもあきらかにされている⁹⁵。

5-3 月桃 (*Alpinia zerumbet*)の持つ機能性

九州南端から沖縄地域に生育する月桃 *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith は、ショウガ科ハナミョウガ属の多年草植物で全株に独特な香りを有し、沖縄県内では昔から食品等に利用されてきた。月桃は亜熱帯種であり、国内では離島含めた沖縄県および南西諸島、南九州に自生する。月桃精油（エッセンシャルオイル）の有効利用については、これまでに国内外の研究機関等より調査研究がされており、照屋、池間らにより抗真菌性、抗菌性、殺虫性、抗酸化活性について調査されている⁹⁶⁻¹⁰¹。また、近年では、エッセンシャルオイルの新たな機能性として、培養された人間の白血球において H₂O₂ に誘発される DNA の損傷を化学的に保護する働き¹⁰²や高度な糖化における最終産生抑制作用が見出されている¹⁰³。今ではその機能性を活用し、化粧水やせっけん、アロマオイルなどに商品化され観光産業における重要な商品として注目されている。また、月桃の抽出物の新たな機能性として幾つかの知見が報告されている。Upadhyay ら¹⁰⁴によれば、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を動物モデルとした *in vitro* 試験での植物由来化合物が近年盛んに行われており、月桃葉抽出液が線虫の寿命に与える影響を調査したところ、ポジティブコントロールや抗がん物質である resveratrol よりも良い 22.6 %の寿命増加が見出されている。さらに、熱的あるいは酸化ストレス下においても月桃葉抽出液が、quercetin よりも優位に生き残ることが見出された。月桃葉抽出液に含まれる化合物が線虫の寿命を延ばしたことで、老化や加齢関連疾患のための栄養補助食品の原料としての可能性が示唆されている。

以上のように、月桃から抽出されるエッセンシャルオイルは、観光産業における機能性化粧品原料にとどまらず医薬品としての利用も検討されている。

しかしながら、月桃に含まれる精油は 0.04~0.07 %^{96,97} と非常にわずかで、水蒸気蒸留による収量も少ないことから高値で取引されている。

5-4 HS-GC/MS による香気特性の解析

5-4-1 実験装置

水中衝撃波による瞬間的高圧処理が月桃の葉、茎に及ぼす効果について検討を行った。瞬間的高圧処理の効果は、SEMによる観察とHS-GC/MSによる月桃葉の香気特性より評価した。Figure 5-2に瞬間的高圧処理を行うための装置概略図を示す。処理装置は、ステンレス製容器、高電圧電源ならびに高電圧の制御装置より構成される。

高電圧電源により800 μF のコンデンサに2~4 kVの高電圧を充電し、ステンレス製容器内において電氣的な瞬間放電により水中衝撃波を発生させた。この時に発生する瞬間的な高圧が、月桃の葉や茎を粉砕する。月桃葉は、シリコン製のチューブ (i.d. 40 mm, o.d. 50 mm) に充填し、水中衝撃波によって生成される瞬間的高圧を負荷した。

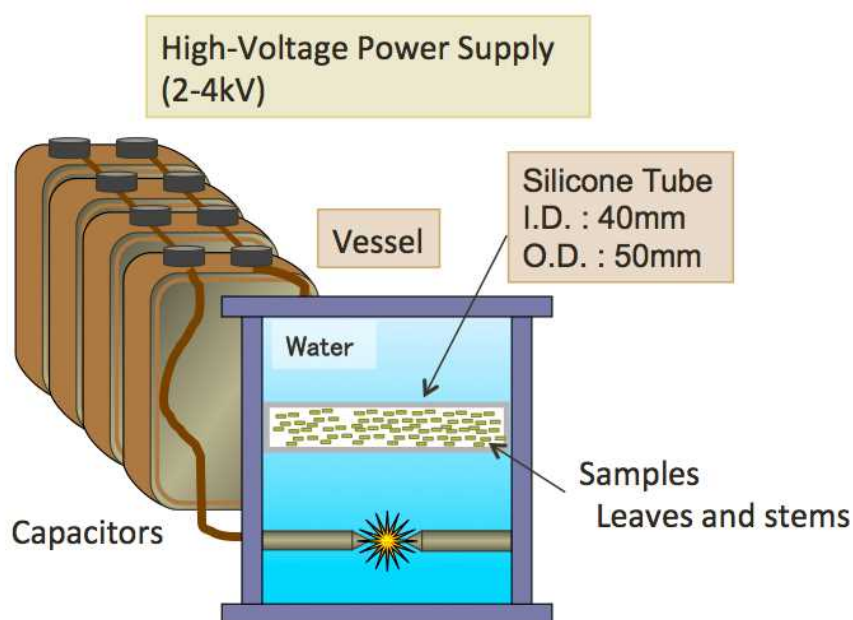


Figure 5-2. Diagram of the processing equipment for underwater shock wave pretreatment of *A. zerumbet* leaves and stems.

5-4-2 月桃葉の水中衝撃波による瞬間的高圧処理

実験に使用した月桃葉は、沖縄県内の企業より提供を受けた。月桃葉は、あらかじめ細かく裁断し、水分量が10-20 %となるまで45 °Cにて乾燥を行ったのち瞬間的高圧処理を行った。この時、水中衝撃波によって生成された高圧は、おおよそ40 MPaと推定される。月桃葉への効果は、走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope, SEM)

により瞬間的高圧の負荷前後の細胞構造の解析と月桃葉からの揮発性成分の中種に及ぼす影響から評価した。月桃葉の電子顕微鏡によるイメージ像は、S-3000N (Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan)を使用し、高真空モードにより観察を行った。

5-4-3 月桃葉の香気成分の解析

月桃葉の揮発性成分は、ヘッドスペース (HS)—ガスクロマトグラフィー—マススペクトロメトリー (HS-GC/MS)により分析を行った。1 gの葉を20 mL容のガスタイトバイアルに入れ、専用のセプタムでシールした。試料は、ヘッドスペースサンプラー (TurboMatrix HS-40, PerkinElmer, Inc., MA, USA)により気相への抽出が平衡に達するように60 °Cで22分間加熱したのち、キャリアーガス(He)により加圧した。気相に抽出された揮発性成分は、0.05 分間、 GC/MS (QP-2010 Plus, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)に導入された。揮発性成分の分析には、ZB-WAX Plus 60 m, 0.32 mm i.d., 膜厚 0.5 μ m (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) のかラムを使用した。GC の昇温条件は次の通りである。 40 °C にて 3 min保持, 5 °C/min にて 165 °Cまで昇温後、引き続き 10 °C/min にて 220 °C 昇温したのち3 min保持した。インジェクターならびにディテクターの温度は、250 °Cとした。測定した質量 m/z のレンジは30 ~ 600 amuとし、GC/MS システムは、島津 GC/MS solution software, version 2.7により制御した。揮発性成分は、リテンションタイム (RT)ならびにマスフラグメントのパターン、MSライブラリより同定を行った。エッセンシャルオイルに含まれていた化合物の定量的な組成は、ピーク面積の測定から算出した。さらに、瞬間的高圧の負荷による揮発性成分の組成の違いについても各成分のピーク面積の測定から評価した。

5-4-4 走査型電子顕微鏡 (SEM)による瞬間的高圧処理の評価

3.0 kV, 3.6 kJ により生成させた瞬間的高圧を負荷した際の月桃葉の SEM 像を示す。Figure 5-3 が負荷前の SEM 像で、Figure 5-4 が負荷後の SEM 像である。瞬間的高圧を負荷する前には、月桃葉の規則的な細胞構造が観察された。負荷後には、Figure 5-4 おいて矢印が示すように、瞬間的高圧により細胞構造が破壊され、細胞壁に多数のクラックが生じているのが観察された。これらの細胞壁に生じた無数のクラックは、衝撃波によるスポーリング破壊のよるものと推察された。また、これらの細胞壁に生じたクラックにより、水蒸気蒸留プロセスにおいて、これらのクラックが蒸留のための水蒸気の通り道となり、より高収量で精油などが回収できる可能性を示した。同様に溶媒抽出においても細胞壁により内部にまで浸透しにくい溶媒が、これらのクラックの生成により容易に細胞内部まで浸透し、より効果的な抽出が期待される。このように水中衝撃波は、細胞内部にまで到達し、月桃葉の細胞壁を選択的に破壊することが明らかとなった。

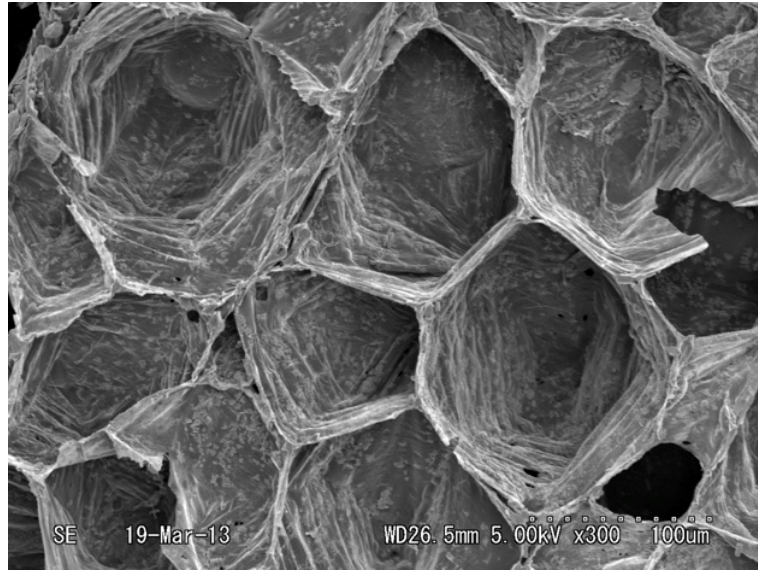


Figure 5-3. SEM image of the cell structure of *A. zerumbet* leaves before shock wave loading.

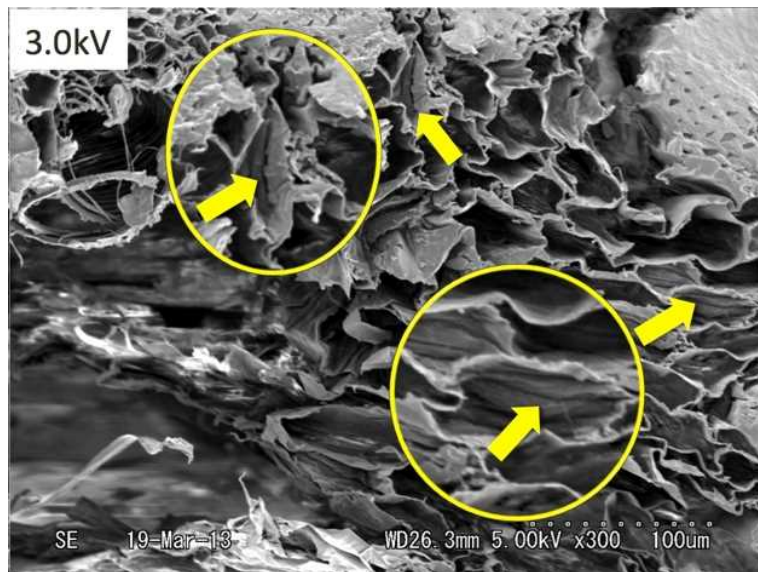


Figure 5-4. SEM image of the cell structure of *A. zerumbet* leaves after shock wave loading at 3.0 kV, 3.6 kJ. Each arrow shows cracks that were generated on the cell walls by the instantaneous high pressure.

5-4-5 月桃葉の香気成分の解析

月桃葉の主な揮発成分についてHS-GC/MSにより解析を行った。HS法を使用することにより、瞬間的高圧処理により細胞壁に生じたクラックの効果を気相に抽出される香気成分の量によって評価が可能となる。Figure 5-5に、水中衝撃波によって処理を行った乾燥月桃葉の主な揮発成分を示す。揮発成分の定量的な評価は、GC/MSのTICクロマトグラムよりピーク面積を算出し、未処理の時の各化合物量を基準に求めた。瞬間的高圧処理は、3.0 kV, 3.6 kJにより1回、2回、3回処理を行い、未処理の結果と比較した。気相に抽出された主な揮発成分として α -pinene, camphene, limonene, 1,8-cineol, α -phellandrene, p-cymene, hexanal, β -pinene, myrcene ならびに camphorが検出された。検出された化合物のうち、これらの化合物は94.3%となった。ほとんどの揮発性化合物は、衝撃波の負荷した回数に応じ、急激に増加した。特に、 α -pinene, camphor, camphene ならびに p-cymeneの濃度は、未処理に比べて4倍近く増加した。1,8-cineolは、未処理のものでは全く検出されなかったため、Figure 5-5では、衝撃波1回処理を基準に濃度を求めている。これらの結果から、衝撃波が内部組織に浸透し、葉や茎の細胞壁を選択的に破壊したため、衝撃波処理によって細胞構造や繊維が粉碎あるいは亀裂を生じ、細胞内部の揮発性成分がこれらのクラックを通じ、加熱によって容易に気相へ気化したものと考えられる。

一方で、hexanalの濃度は、衝撃波の負荷に対し全く影響を与えなかった。Hexanalは、葉の様々な場所に分布しており、細胞壁のクラックの存在に関係なく容易に気化したため影響を受けなかったものと考えられる。 α -Phellandrene と myrceneは、他の化合物と同じように、葉を細かく破碎し、低温で乾燥したときに葉の表面に吸着、あるいは葉の内部から浸み出しているにもかかわらず、最初の衝撃波による処理以降、その濃度は増加しなかった。最初の衝撃波処理によってこれらの化合物の大部分がとり除かれ、その後はこれらの化合物は細胞のより内部に分布しているので気化しにくい。そのためこれらの濃度はいったん減少したものと推察される。しかしながら、繰り返し高圧処理を行うことでこれらの化合物は気化し、再び増加したものと考えられる。

以上の結果から、月桃の葉や茎の前処理として衝撃波処理の適用することで、月桃葉の水蒸気蒸留などの抽出プロセスの前処理として、より効果的に抽出できることを

期待させる結果となった。SEM観察から衝撃波の負荷によりスポーリング破壊に起因する無数のクラックが月桃葉の細胞壁に形成することが確認された。抽出されたほとんどの成分の気相の濃度は、衝撃波よりの回数に応じて増加した。

さらに、幾つかの化合物の濃度は、未処理と比較し4倍以上に増加した。これらの結果から、エッセンシャルオイルなどの抽出効率の改善に非常に有用であることが明らかとなった。本実験のような繰り返し処理は、瞬間的電気放電による瞬間的高圧の利用を可能にするだけでなく、エッセンシャルオイルの工業的なスケールでの連続処理を可能にするものと考えられる。それゆえに、将来的に試料を連続的に送り込める水中衝撃波処理のための容器や繰り返し衝撃波処理によって抽出が可能なプロセスの開発が必要である。

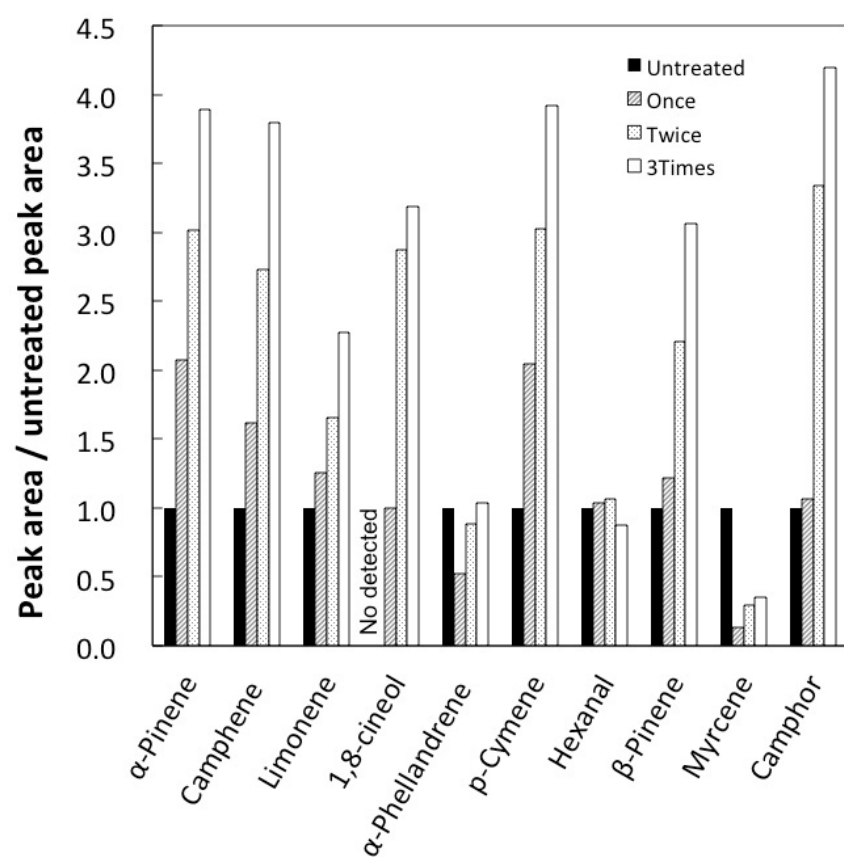


Figure 5-5. Volatile compounds of dried leaves and stems of *A. zerumbet* treated by underwater shock wave under various conditions.

5-5 瞬間的高圧処理とBME溶液による直接抽出

BME は、熱力学的に安定な親油性と親水性の溶媒間に水と油が両連続的に共存し、親油性の高い化合物と親水性の高い化合物の両者を同時に溶解することができる。第2章から第3章まで食品に含まれる抗酸化物質の評価における新たな反応場として検討を行ってきた。さらに第4章では、エッセンシャルオイル中の抗酸化物質の評価についても検討した。本節では、前節の水中衝撃波により発生する瞬間的高圧を利用し、BME を抽出溶媒として固体からの高効率直接抽出を試み、抗酸化能評価の前処理技術としての可能性について検討を行った。

5-5-1 実験装置

BME溶液による抗酸化物質の抽出試験を行う試料は、月桃葉として抽出試験を行った。瞬間的高圧処理の効果は、SEMによる観察とHS-GC/MSによる月桃葉の香気特性より評価した。瞬間的高圧処理は、Figure 5-2に示す装置を使用した。瞬間的高圧処理の発生方法は、高電圧電源により800 μ F のコンデンサに3.5 kVの高電圧を充電し、ステンレス製容器内においてアルミニウム細線 (Al Wire) 1.2 mm ϕ 、ギャップ 10 mm による瞬間的放電により発生させた。この時に発生する瞬間的な高圧が、月桃の葉や茎を粉砕する。月桃葉は、あらかじめガーデンシュレッダーで破碎し、15 %の水分量となるまで50 $^{\circ}$ Cにて低温乾燥を行ったのち、シリコン製のチューブ (i.d. 25 mm, o.d. 30 mm) に充填して水中衝撃波によって生成される瞬間的高圧を負荷した。

5-5-2 BME溶液による月桃葉からの抗酸化物質の直接抽出

BME溶液による抗酸化物質の直接抽出の試験として、あらかじめ水中衝撃波による瞬間的高圧処理を行った月桃葉について行った。Figure 5-6に、水中衝撃波 (3.5 kV, 4.9 kJ, Al Wire 1.2mm ϕ , ギャップ 10 mm)による瞬間的高圧処理を行った月桃葉の状態を示す。瞬間的高圧処理を行うことで、乾燥した月桃葉は、処理回数に応じ破碎されていく様子が観察された。瞬間的高圧処理をおこなった月桃は、シリコン製のチューブから取り出したのち速やかに0.5 gを密閉できるガラス製のバイアルに秤量し、

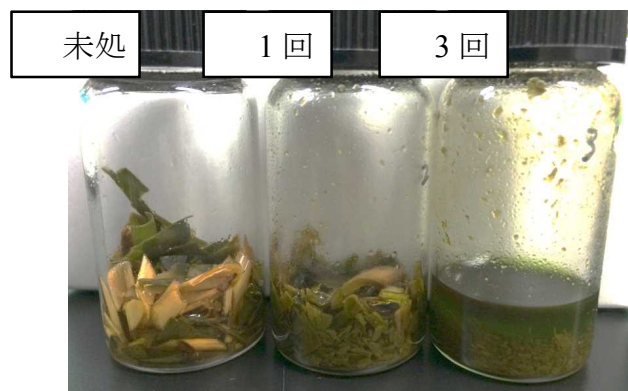
BME溶液を5 mL加えた。抽出に使用したBME溶液は、これまで使用したBMEと同じNaCl aq./SDS+2-butanol/toluene系を使用した。BME作成に必要な試薬、方法は、すでに第2章で述べたBME溶液と同じ組成のものを使用したため、割愛する。



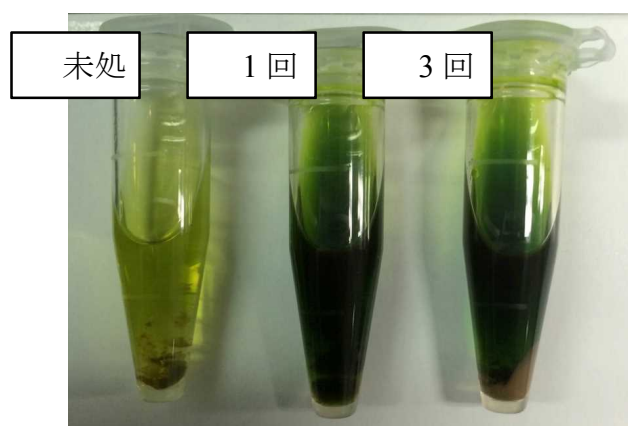
Figure 5-6. 水中衝撃波(3.5 kV, 4.9 kJ, Al Wire 1.2mm ϕ , ギャップ 10 mm)による瞬間的高圧処理を行った月桃葉

Figure 5-7 (A) に瞬間的高圧を負荷した月桃葉 0.5 gにBME溶液 5mLを加え10 min 振とう攪拌をおこなった様子を示す。瞬間的高圧処理を行うことで、乾燥した月桃葉は、処理回数に応じ破碎されているため、未処理のものは、乾燥後の元型をとどめているが、処理3回ではその大部分が粉末状になり、固液の分離が容易な状態となった。さらに、Figure 5-7 (B) に上清を別容器に移し遠心分離後のBME抽出液の様子を示す。瞬間的高圧処理を行うことで、葉緑素による緑色の呈色が増し、BME溶液に月桃葉の成分がより抽出されている様子が観察された。処理回数1回、3回にでは、目視による大きな差異が見られなかった。

抽出液の抗酸化能を評価するために、BME-EC法によりITO電極ならびにF-ECR電極で測定を行い、抽出液の抗酸化能を評価した。



(A) BME溶液 5mLを加え10 min振とう攪拌



(B) 上清を別容器に移し遠心分離後のBME抽出液

Figure 5-7. (A) 瞬間的高圧を負荷した月桃葉 0.5 gにBME溶液 5mLを加え10 min振とう攪拌をおこなった様子ならびに (B) 上清を別容器に移し遠心分離後の抽出液の様子

5-6 BME抽出液のBME-EC法による抗酸化能の評価

BME抽出液の抗酸化能を評価するために、BME-EC法によりITO電極ならびにF-ECR電極で測定を行った。なお、CV測定で用いた器具・装置も第2章と同じものを用いたため割愛する。

電気化学測定は、遠心分離後の抽出液を取り出し、作用極として親水性のITO電極ならびにF-ECR電極を用いた。電気化学測定は、電気化学測定装置（ポテンショスタット）を使用し、サイクリックボルタンメトリー（Cyclic Voltammetry, CV）により、BME抽出液の分析を行った。Pt線（対極）、参照電極（R.E.）として飽和カルメル電極（SCE）を含めた3電極をBME溶液に浸して測定を行った。また、CVの繰り返し測定による電極表面の汚染を防ぐため、実験は全てFirst Scanで行った。温度は25 °C（室温）で測定を行った。また、特に脱気は行わず測定を行った。電極面積は、内径5mmφのO-リングにより規制し、幾何学的な面積を電極面積とした。あらかじめ抗酸化物質の標準として、所定の濃度のTroloxをITO電極ならびにF-ECR電極にて測定し、CVの応答に基づく電気量から抗酸化活性($\mu\text{mol TE/ml}$)の検量線を作成した。BME抽出液についてもITO電極ならびにF-ECR電極にて同様に測定し、CVの応答に基づく電気量から抗酸化活性を求めた。

Figure 5-8にITO電極によるBME抽出溶液のサイクリックボルタモグラムを示す。月桃葉から直接抽出を行なったいずれのBME溶液において、0.2 V付近から酸化電流が観測され、1.0 V付近までブロードな酸化電流が観察された。月桃葉のBME溶液による直接抽出では、これまで2~4章で使用したサンプルでは観察されなかった還元電流も0.3 V付近に観察され、可逆反応を示す抗酸化物質の存在が確認できた。1.0 Vの酸化電流は、未処理、瞬間的高圧処理1回、3回においてそれぞれ、67.4, 270, 190 $\mu\text{A cm}^{-2}$ となり瞬間的高圧処理1回最も大きく、ついで3回処理したサンプルとなった。瞬間的高圧処理を3回行うことによって、1.0 Vにおけるピーク電流値は低下するものの、0.2 V付近から酸化電流が観測されるようになり、抽出される抗酸化物質の構成が変化しているものと考えられる。

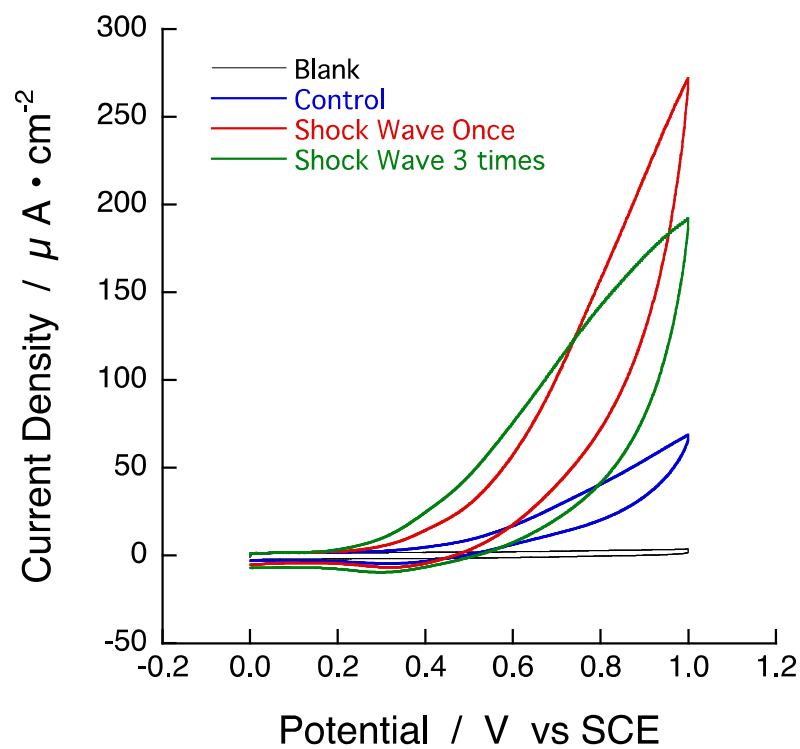


Figure 5-8. ITO 電極による BME 抽出溶液のサイクリックボルタモグラム (Scan rate: 0.1 V/s)

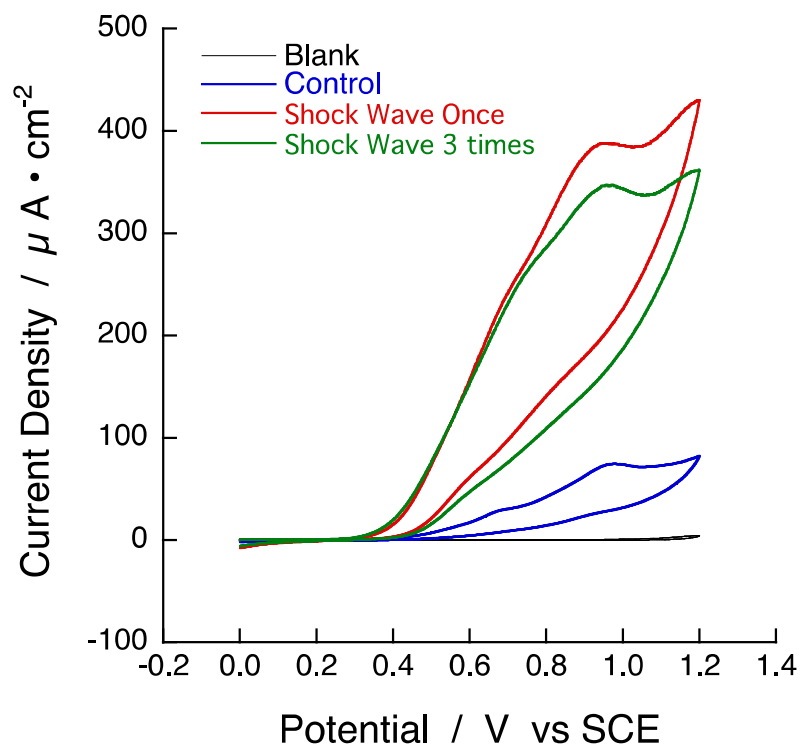


Figure 5-9. F-ECR 電極による BME 抽出溶液のサイクリックボルタモグラム (Scan rate: 0.1 V/s)

Figure 5-9にF-ECR電極によるBME抽出溶液のサイクリックボルタモグラムを示す。ITO電極の時と同様、月桃葉から直接抽出を行ったいずれのBME溶液において、0.35 V付近から酸化電流が観測され、1.2 V付近までブロードな酸化電流が観察された。F-ECR電極によるBME抽出溶液のサイクリックボルタモグラムでは、ITO電極の時とは異なり、不可逆な酸化ピークのみが観察される一方、0.7 Vならびに0.9 V付近に、明確な酸化ピークが観察された。0.9 Vの酸化電流は、未処理、瞬間的高圧処理 1回、3回においてそれぞれ、74.6, 388, 347 $\mu\text{A cm}^{-2}$ となりITO電極の時と同様、瞬間的高圧処理 1回最も大きく、ついで3回処理したサンプルとなった。

Figure 5-10に、瞬間的高圧処理条件（未処理 ; Control、1回 ; SW1、3回 ; SW3）におけるBME抽出溶液のBME-EC法による電気量Qを示す。ITO電極では、未処理、瞬間的高圧処理 1回、3回においてそれぞれ、0.17, 0.68, 0.64 mC cm^{-2} となり、瞬間的高圧を1回付加するだけで、抗酸化活性はほとんど一定の値を示し、十分な効果が得られていることが明らかとなった。この時の月桃葉 1 gあたりの抗酸化活性は、それぞれ9.99, 40.0, 37.6 $\mu\text{mol TE/g}$ となった。F-ECR電極では、未処理、瞬間的高圧処理 1回、3回においてそれぞれ、0.33, 2.12, 1.92 mC cm^{-2} となり、瞬間的高圧の負荷で大幅に抽出液の抗酸化活性が上昇するものの、3回負荷した場合には、1回の負荷に対しやや低下する結果となった。この現象は、瞬間的高圧処理を行うことで月桃葉の細胞壁にクラックが生じ、抽出効果が飛躍的に改善される一方、空気中の酸素により抗酸化物質の酸化が進み、特に瞬間的高圧処理を3回まで行くと、抗酸化物質の損失が一気に進むものと思われる。なお、F-ECR電極より算出した月桃葉 1 gあたりの抗酸化活性は、それぞれ11.1, 71.6, 64.9 $\mu\text{mol TE/g}$ となった。

BME抽出液 500 μL を第2章で調整した3相のBME溶液に一度戻し、攪拌、静置したのち、マクロtoluene相ならびにマクロ水相の吸収スペクトルを測定した。マクロtoluene相は、月桃葉から抽出されたChlorophyllによると思われる鮮やかな緑色を示す一方、マクロ水相は、薄い黄色から赤味がかかった色となった。マクロtoluene相は、tolueneをリファレンスに、マクロ水相は、1.0 M NaCl + 50 mM phosphate bufferをリファレンスに、300 ~ 700nmの吸収スペクトルを測定した。Figure 5-11 にマクロtoluene相ならびにマクロ水相の吸収スペクトルを示す。

以上のように瞬間的高圧処理を3回行うことによって、1.0 Vにおけるピーク電流値は低下するものの、0.2 V付近から酸化電流が観測されるようになり、抽出される抗酸化物質の構成が変化しているものと考えられる。

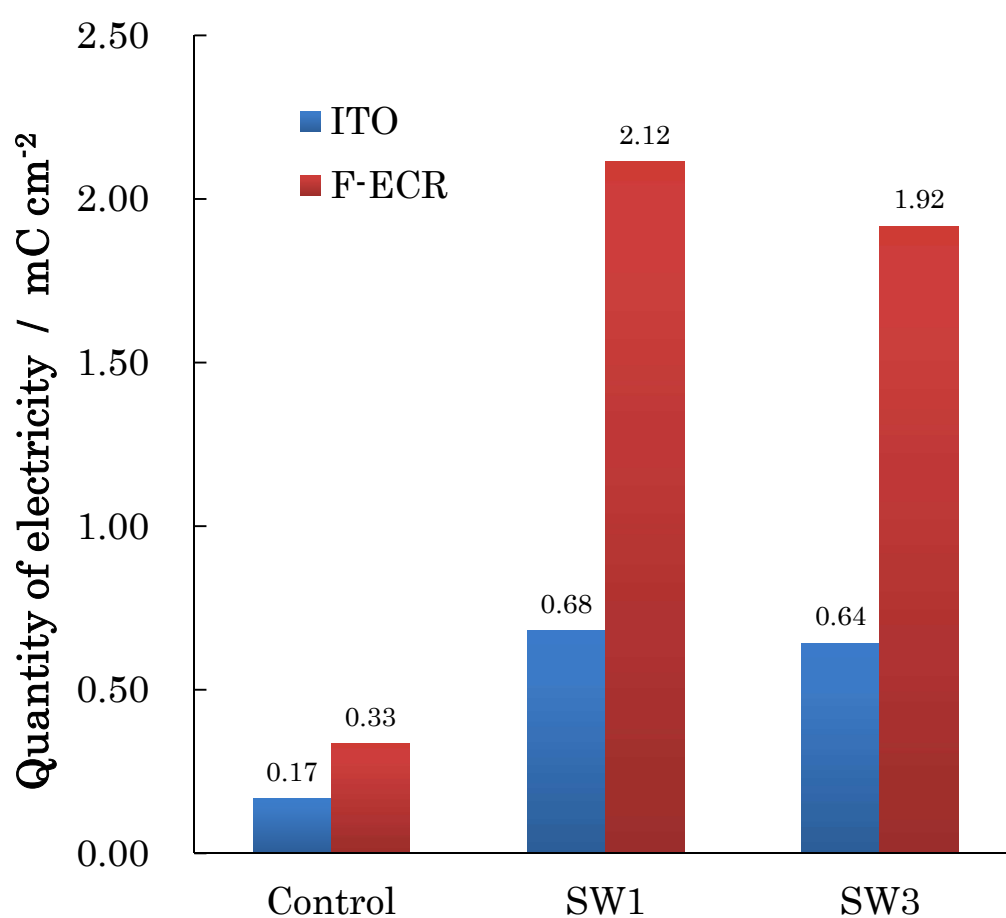


Figure 5-10. 瞬間的高圧処理条件（未処理 ; Control、SW1 ; 1 回、SW3 ; 3 回）における BME 抽出溶液の BME-EC 法による電気量 Q

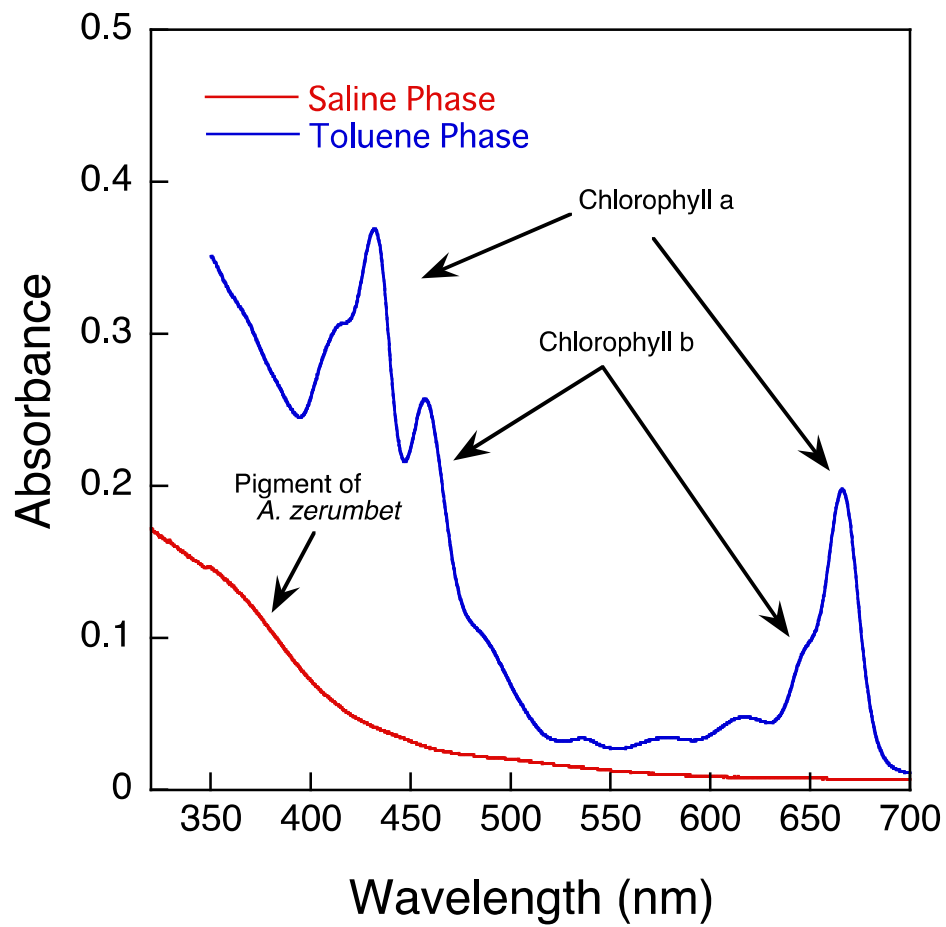


Figure 5-11. 月桃の葉より直接抽出した BME 抽出液 500 μ L を 3 相の BME に添加後のマクロ toluene 相ならびにマクロ水相の吸収スペクトル

鮮やかな緑色を呈したマクロ toluene 相の吸収スペクトルは、Chlorophyll a ならびに Chlorophyll b に特徴的な吸収スペクトルを示し^{105,106}、Chlorophyll a ならびに Chlorophyll b は、663.6 ならびに 646.6nm の吸光度から、それぞれ 2.1, 0.79mg/g と見積もられた。

一方、マクロ水相の吸収スペクトルでは、Chlorophyll 由来の吸収は全く見られなかった。また、月桃葉に含まれる淡赤色の水溶性色素由来と思われる 350~380 nm に吸収が見られた。月桃葉に含まれる淡赤色の水溶性色素は、これまでの研究で高い抗酸化活性を示すことが明らかとなっており、ITO 電極によって測定された抗酸化物質は、水溶性色素によるところが大きいと考えられる。

以上の結果から、月桃葉を BME 溶液で直接抽出を行った際に、Chlorophyll は、ミクロ toluene 相に完全に分配し、月桃葉に含まれる水溶性抗酸化物質は、ミクロ水相に分配していることが明らかとなった。

5-7 結 語

本章では、水中衝撃波により発生する瞬間的高圧によって、化学的ダメージを与えずに植物の細胞や組織を破壊しつつ、BMEを抽出溶媒とすることで、固体からの高効率直接抽出を試み、抗酸化能評価の前処理技術としての可能性について検討を行った。SEM観察から、水中衝撃波による瞬間的高圧の負荷によるスポーリング破壊にともない、植物の細胞壁に無数のクラックが形成しているのが確認された。HS-GC/MSによる揮発性成分の分析からも、抽出されたほとんどの成分の気相濃度が、衝撃波処理の回数に応じて増加した。衝撃波処理を行った後、BME溶液を使用して固体から直接抽出を行い、BME溶液の抗酸化能をBME-EC法により評価したところ、衝撃波処理3.5 kV, 3.6kJ、1回処理を行うだけで、親水性ならびに親油性抗酸化物質ともに最大限抽出できることが明らかとなった。

第6章 結 語

本論文では両連続相マイクロエマルジョンを用いた抗酸化物質の評価技術に関する研究に関して報告した。

第2章では、界面活性剤により親油性と親水性の溶媒が熱力学的に安定となるBMEを反応場とし、代表的な抗酸化物質について電気化学的な分析を試みた。電極表面の親水性や親油性を制御することでBME中におけるミクロ水相とミクロ油相への電気化学的なコンタクトを変化させ、同じBME中において親水性、親油性、両親媒性化合物のそれぞれ個々の抗酸化活性を個別に測定することを実現した。BME-EC法を応用しBME中で親水性と親油性物質の抗酸化能を個別に電気化学的に定量分析を行えるか検討を行った。その結果、機能性食品のための分析的な可能性を証明した。酸化ピーク面積より算出される電気量により、親水性化合物や親油性化合物などそれぞれ同時にトータルの抗酸化活性を評価できることを示した。液体食品中の抗酸化活性は、 α -tocophenolのような代表的な抗酸化物質のみかけの濃度として見積もられた。このように本章で提案した新しい測定方法は、単に抗酸化物質の電気化学的なレスポンスを測定するだけであるが、酸化ピーク面積による電気量から液体食品中の抗酸化活性を測定することを可能とする。

本章では、極端に電極表面の親水性／親油性を変えた電極と親水性／親油性のバランスのとれたBMEの組み合わせを用いることで、シンプルなサイクリックボルタメトリー分析により抽出操作をすることなく、いくつかの化合物の抗酸化活性を個々に調査した。様々な電極との組み合わせにより、BME中の電気化学において同時マルチモード分析の方法を構築したとともに、機能性液体食品の抗酸化活性の分析の枠組みを越え、あらゆる分野に適用できる可能性を示した。

第3章では、BME-EC法を用いてolive oilの抗酸化活性を評価し、BME溶液中におけるolive oilの電気化学的な特性を調査した。本研究で提案したBME-EC法と総ポリフェノール量の測定やORAC分析の比較を行い、olive oil中の抗酸化物質の評価を行い、総抗酸化活性の直接分析が可能か検討を行った。その結果、olive oil中の抗酸化物質の定量分析において、BME-EC法の高い適用性ならびに信頼性を明確に示した。

提案した BME-EC 法は、olive oil 中の抗酸化物質の分析において、従来の分析法に匹敵する信頼できる良い結果を示した。この方法は、抽出操作が不要で、簡単、迅速、高い再現性を有する画期的な分析であり、本方法は、食用油を超える分析対象物や媒体など広い領域に適用できる可能性を示した。

第 4 章では、両連続相マイクロエマルジョン BME の特異的な反応場を応用し、エッセンシャルオイルの新たな抗酸化能評価法として BME-EC 法の検討を行った。エッセンシャルオイルの機能性探索には、DPPH (2,2-diphenyl- 1-picrylhydrazyl) フリーラジカルによる抗酸化能の測定—DPPH 法が一般に行われているが、カイネティックな反応であるために、反応時間はもとより酸化体／還元体比、溶媒の種類、含水量や pH、遷移金属イオンの影響など受けやすく、測定条件や測定者によるばらつきの問題が指摘されていた。本章では、一般に市販されているエッセンシャルオイルについて BME-EC 法により抗酸化能の評価を行った。エッセンシャルオイルの抗酸化能を評価する標準物質、 α -tocopherol, BHA, BHT, Trolox と BME-EC 法による酸化ピークから求めた電気量 Q と良い相関が得られた。また、BME-EC 法によって得られたエッセンシャルオイルの抗酸化活性と従来の DPPH 法とも良い相関があることを明らかにした。さらに、ミクロ水相に分配する抗酸化物質の存在を確認するために、エッセンシャルオイルを溶解した BME 溶液の ITO 電極による BME-EC 法に基づく抗酸化活性の評価を行ったところ、いくつかのエッセンシャルオイルにミクロ水相に分配する抗酸化物質を含むものも確認できた。BME-EC 法では、エッセンシャルオイルの抗酸化能を迅速かつ簡便に測定できることに加え、従来の DPPH 法では明らかにできなかった親水性（両親媒性）／親油性の抗酸化活性もエッセンシャルオイルの新たな特徴として評価できる可能性を示した。

第 5 章では、水中衝撃波により発生する瞬間的高圧によって、化学的ダメージを与えずに植物の細胞や組織に破壊しつつ、BME を抽出溶媒とすることで、固体からの高効率直接抽出を試み、抗酸化能評価の前処理技術としての可能性について検討を行った。SEM 観察から、水中衝撃波による瞬間的高圧の負荷によるスポーリング破壊にともない、植物の細胞壁に無数のクラックが形成しているのが確認された。HS-GC/MS による揮発性成分の分析からも、抽出されたほとんどの成分の気相濃度が、

衝撃波処理の回数に応じて増加した。衝撃波処理を行った後、BME 溶液を使用して固体から直接抽出を行い、BME 溶液の抗酸化能を BME-EC 法により評価したところ、衝撃波処理 3.5 kV, 3.6kJ、1 回処理を行うだけで、親水性ならびに親油性抗酸化物質ともに最大限抽出できることが明らかとなった。BME を溶媒として直接抽出した溶液中には、親水性／親油性の抗酸化物質が、ミクロ水相、ミクロ油相にそれぞれ分配された状態で抽出され、BME-EC 法ならびに吸光度測定による吸収スペクトルからも親水性／親油性の抗酸化物質がそれぞれミクロ水相、ミクロ油相に分配していることが確認された。従来までの酸化剤の還元による色の変化を通して測定を行う分光測定や抗酸化物質と基質（Probe）とのフリーラジカルに対する競合反応に基づく分光蛍光分析では、測定困難な抽出物でも、迅速かつ簡便に総抗酸化活性を評価することができた。水中衝撃波により発生する瞬間的高圧処理と、親水性／親油性化合物を同時に溶解することのできる BME を抽出溶媒とすることで、あらゆる分野における抽出物の親水性／両親媒性／親油性化合物を個々にあるいは同時に測定できる可能性を示した。

本論文では、食品の機能性への関心が一層高まる中で、食品や機能性素材の持つ抗酸化活性を評価する新たな技術の開発を行った。抗酸化活性の評価技術はこれまで多くの方法が提案・実用化されてきたが、総抗酸化活性は、フェノール化合物を含む親水性／両親媒性／親油性といった様々な抗酸化物質の組み合わせによる活性であるため、目的物質の抽出プロセスも含め、煩雑さや抽出効率、抗酸化能評価における再現性など依然、多くの課題を有していた。電気化学分析においても、これまで簡便に物質の酸化力を測定できることから、食品の抗酸化物質の測定法として電気化学分析による抗酸化活性の評価が試みられてきたが、従来の化学分析と同様の前処理や抽出操作が必要な場合もあり、また、HPLC のような高感度で個々の抗酸化物質の個別分析のような十分な感度、分離が得られないために、実用化には至らなかった。

本論文で提案した新たな抗酸化活性の評価技術は、これらの問題を根本から解決するものである。熱力学的に安定な BME を反応場とするだけでなく、親油性化合物と親水性化合物の両者を同時に溶解し、加えて電気化学分析で使用する電極界面の親水性／親油性を制御することで、これまで非常に困難とされてきた toluene のような有

機溶媒中での抗酸化物質の電気化学的な測定を可能とした。そのことで、食用油を代表する olive oil 中の抗酸化物質を、抽出操作を行うことなく BME に溶解するだけでその抗酸化能の評価が可能となった。食用油の抗酸化能を直接かつ簡便に測定することができるようになったことで、これまで多大な時間を費やしていた食用油の機能性評価や、抗酸化物質を指標とする品質評価、さらには cacao (*Theobroma cacao*) などに代表される高脂肪含有の機能性食材の評価などが簡便に行えるようになる。

さらに、本論文で提案した新たな抗酸化活性の評価技術は、食品分析にとどまらず、エッセンシャルオイルや植物からの抽出物の抗酸化能評価に適用できたことから、様々な素材の分析評価に応用できると考えられる。とくに、親油性抗酸化物質や emulsion を多用する化粧品の機能性評価への展開が期待される。また、水中衝撃波により発生する瞬間的高圧を前処理に使用することで、抗酸化物質をはじめ含有する化合物を高効率で抽出することが可能となったことから、これまで抽出プロセスが煩雑であった素材からの抽出も容易になると考えられ、抽出から測定・評価まで非常に簡便かつ迅速に行うことができると考えられ、実際に使用できるデバイスが開発されることを期待される。

参考文献

1. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
2. Podsędek, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Sci. Technol.* **40**, 1–11 (2007).
3. Gil, E. S. & Couto, R. O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. *Rev. Bras. Farmacogn.* **23**, 542–558 (2013).
4. Tripoli, E., Guardia, M. La, Giammanco, S., Majo, D. Di & Giammanco, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* **104**, 466–479 (2007).
5. KAZUNARI, K., KURIHARA MASAOKI & KIYOSHI, F. Mechanism of Antioxidant Effect of Catechins. *METHODS Enzymol.* **335**, 203–217 (2001).
6. Dufresne, C. J. & Farnworth, E. R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J. Nutr. Biochem.* **12**, 404–421 (2001).
7. Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841–56 (2005).
8. Decker, E. A., Warner, K., Richards, M. P. & Shahidi, F. Measuring antioxidant effectiveness in food. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4303–10 (2005).
9. SA, O. & MZ., T. Measuring antioxidant and prooxidant capacity using the Crocin Bleaching Assay (CBA). *Methods Mol Biol.* **1208**, 329–344 (2015).
10. Prior, R. L. *et al.* Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3273–3279 (2003).
11. Karadag, A., Ozcelik, B. & Saner, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods* **2**, 41–60 (2009).

12. Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O. & Dommes, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* **113**, 1226–1233 (2009).
13. 二木鋭雄. Topics on capacity and beneficial effects of antioxidants: Removal of ORAC database by USDA Radical scavenging. ビタミン **9**, 519–520 (2012).
14. 中川清子 & 関口正之. ESR を利用した OH ラジカル消去能測定システムの検討. 東京都立産業技術研究センター研究報告 **7**, 122–123 (2012).
15. Komatsu-Watanabe, R. *et al.* Quantitative Spin-trapping ESR Investigation on Reaction of Hydroxyl Radical and Selected Scavengers by a Newly Developed Flow-injection ESR System. *Chem. Lett.* **37**, 612–613 (2008).
16. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152–179 (1999).
17. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**, 25–30 (1995).
18. Deng, J., Cheng, W. & Yang, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chem.* **125**, 1430–1435 (2011).
19. Wu, X. *et al.* Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *J. Food Compos. Anal.* **17**, 407–422 (2004).
20. Ou, B. *et al.* Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2772–7 (2002).
21. Sharma, O. P. & Bhat, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* **113**, 1202–1205 (2009).

22. Dawidowicz, A. L., Wianowska, D. & Olszowy, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chem.* **131**, 1037–1043 (2012).
23. Mishra, K., Ojha, H. & Chaudhury, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem.* **130**, 1036–1043 (2012).
24. Watanabe, J. *et al.* Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. *Anal. Sci.* **28**, 159–65 (2012).
25. Kilmartin, P. A. & Hsu, C. F. Characterisation of polyphenols in green , oolong , and black teas , and in coffee , using cyclic voltammetry. *Food Chem.* **82**, 501–512 (2003).
26. Kilmartin, P. A., Zou, H. & Waterhouse, A. L. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1957–65 (2001).
27. Makhotkina, O. & Kilmartin, P. A. Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method : Cyclic voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **633**, 165–174 (2009).
28. Makhotkina, O. & Kilmartin, P. A. The use of cyclic voltammetry for wine analysis: determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Anal. Chim. Acta* **668**, 155–65 (2010).
29. Kunitake, M., Sakata, K. & Nishimi, T. *Mesostructured Polymer Materials Based on Bicontinuous Microemulsions. Microemulsions - An Introd. to Prop. Appl.* (InTech, Chapters published, 2012). doi:10.5772/2300

30. Guégring, P. & Lindman, B. Droplet and bicontinuous structures in microemulsions from multicomponent self-diffusion measurements. *Langmuir* **1**, 464–468 (1985).
31. Yoshitake, S. *et al.* Electrochemistry in Middle Phase Microemulsion Composed of Saline and Toluene with Sodium Dodecylsulfate and n-Butanol. *Chem. Lett.* 360–360 (2002). doi:10.1246/cl.2002.360
32. Kunitake, M. *et al.* Alternative or Simultaneous Electrochemical Access with Micro Water/Oil Phases in a Middle Phase Microemulsion Based on the Hydrophilic/Lipophilic Balance on Electrode Surfaces. *Chem. Lett.* **34**, 1338–1339 (2005).
33. Makita, Y. *et al.* Electrochemical Investigation of Dynamic Solution Structures of Bicontinuous Microemulsion at Solid Interfaces. *Chem. Lett.* **39**, 1152–1154 (2010).
34. Fogliano, V. *et al.* Antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in a micellar system. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1803–1808 (1999).
35. Carrasco-Pancorbo, A. *et al.* Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8918–25 (2005).
36. Wei Lin Sandra Sim, Han, M. Y., Huang, D. & Sim, W. L. S. Quantification of antioxidant capacity in a microemulsion system: synergistic effects of chlorogenic acid with alpha-tocopherol. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3409–14 (2009).
37. Chýlková, J., Tomášková, M., Mikysek, T., Šelešovská, R. & Jehlička, J. Voltammetric Determination of BHT Antioxidant at Gold Electrode in Biodiesel. *Electroanalysis* **24**, 1374–1379 (2012).
38. Ziyatdinova, G. K., Nizamova, A. M. & Budnikov, H. C. Voltammetric determination of curcumin in spices. *J. Anal. Chem.* **67**, 591–594 (2012).

39. Blasco, A. J., Barrigas, I., González, M. C. & Escarpa, A. Fast and simultaneous detection of prominent natural antioxidants using analytical microsystems for capillary electrophoresis with a glassy carbon electrode: a new gateway to food environments. *Electrophoresis* **26**, 4664–73 (2005).
40. Iwunze, M. O., Sucheta, A. & Rusling, J. F. Bicontinuous Microemulsions as Media for Electrochemical Studies. *Anal. Chem.* **62**, 644–649 (1990).
41. Sekioka, N. *et al.* Controllable electrode activities of nano-carbon films while maintaining surface flatness by electrochemical pretreatment. *Carbon N. Y.* **46**, 1918–1926 (2008).
42. Ueda, A. *et al.* Fabrication of electrochemically stable fluorinated nano-carbon film compared with other fluorinated carbon materials. *Carbon N. Y.* **47**, 1943–1952 (2009).
43. Niwa, O. *et al.* Electrochemical Performance of Angstrom Level Flat Sputtered Carbon Film Consisting of sp² and sp³ Mixed Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7144–7145 (2006).
44. Kato, D. *et al.* A Nano-Carbon Film Electrode as a Platform for Exploring DNA Methylation. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3716–3717 (2008).
45. Kato, D. *et al.* Nanohybrid carbon film for electrochemical detection of SNPs without hybridization or labeling. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 6681–6684 (2008).
46. Kato, D. *et al.* Electrochemical DNA Methylation Detection for Enzymatically Digested CpG Oligonucleotides. *Anal. Chem.* **83**, 7595–7599 (2011).
47. Kato, D., Sumimoto, M., Ueda, A., Hirono, S. & Niwa, O. Evaluation of Electrokinetic Parameters for All DNA Bases with Sputter Deposited Nanocarbon Film Electrode. *Anal. Chem.* **84**, 10607–10613 (2012).

48. Matos, L. C., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Seabra, R. M. & Oliveira, M. B. P. Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. *Food Chem.* **102**, 976–983 (2007).
49. Cämmerer, B. & Kroh, L. W. Antioxidant activity of coffee brews. *Eur. Food Res. Technol.* **223**, 469–474 (2006).
50. Risso, É. M., Péres, R. G. & Amaya-Farfan, J. Determination of phenolic acids in coffee by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem.* **105**, 1578–1582 (2007).
51. Visioli, F., Bellomo, G. & Galli, C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 60–64 (1998).
52. Pellegrini, N., Visioli, F., Buratti, S. & Brighenti, F. Direct Analysis of Total Antioxidant Activity of Olive Oil and Studies on the Influence of Heating. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2532–2538 (2001).
53. Ninfali, P., Aluigi, G., Bacchiocca, M. & Magnani, M. Antioxidant capacity of extra-virgin olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**, 243–247 (2001).
54. Cicerale, S., Lucas, L. & Keast, R. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 129–135 (2012).
55. Killeen, M. J., Pontoniere, P. & Crea, R. Hydroxytyrosol An examination of its potential role in cardiovascular disease, inflammation, and longevity. *Agro FOOD Ind. Hi Tech* **22**, 16–19 (2011).
56. Machowetz, A. *et al.* Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *FASEB J.* **21**, 45–52 (2007).
57. Salvini, S. *et al.* Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br. J. Nutr.* **95**, 742–751 (2006).

58. Owen, R. W. *et al.* The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer* **36**, 1235–1247 (2000).
59. Malyszko, J. & Karbarz, M. Electrochemical oxidation of trolox and α -tocopherol in acetic acid: A comparative study. *J. Electroanal. Chem.* **595**, 136–144 (2006).
60. Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D. & Pittia, P. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Res. Int.* **42**, 1163–1170 (2009).
61. Benedetti, S., Cosio, M. S., Scampicchio, M. & Mannino, S. Nanoemulsions for the Determination of the Antioxidant Capacity of Oils by an Electrochemical Method. *Electroanalysis* **24**, 1356–1361 (2012).
62. Mannino, S., Buratti, S., Cosio, M. S. & Pellegrini, N. Evaluation of the ‘antioxidant power’ of olive oils based on a FIA system with amperometric detection. *Analyst* **124**, 1115–1118 (1999).
63. Owen, R. W. *et al.* Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 647–59 (2000).
64. Mazzotti, F. *et al.* Assay of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil by tandem mass spectrometry and isotope dilution method. *Food Chem.* **135**, 1006–1010 (2012).
65. Szydłowska-Czerniak, A., Karlovits, G., Dianoczki, C., Recseg, K. & Szlyk, E. Comparison of Two Analytical Methods for Assessing Antioxidant Capacity of Rapeseed and Olive Oils. *J. Am. Oli Chem. Soc.* **85**, 141–149 (2008).
66. Iwunze, M. O., Sucheta, A. & Rusling, J. F. Bicontinuous microemulsions as media for electrochemical studies. *Anal. Chem.* **62**, 644–9 (1990).

67. Kuraya, E. *et al.* Simultaneous Electrochemical Analysis of Hydrophilic and Lipophilic Antioxidants in Bicontinuous Microemulsion. *Anal. Chem.* **87**, 1489–1493 (2015).
68. Choo, Y. M., Ng, M. H., Ma, A. N., Chuah, C. H. & Hashim, M. A. Application of supercritical fluid chromatography in the quantitative analysis of minor components (carotenes, vitamin E, sterols, and squalene) from palm oil. *Lipids* **40**, 429–432 (2005).
69. Aubin, A. Analysis of Fat-Soluble Vitamin Capsules using UltraPerformance Convergence Chromatography (UPC2). *Waters Appl. Note* **72000439en**, June (2012).
70. Ramos-Escudero, F., Morales, M. T. & G. Asuero, A. Characterization of Bioactive Compounds from Monovarietal Virgin Olive Oils : Relationship Between Phenolic Compounds-Antioxidant Capacities. *Int. J. Food Prop.* **18**, 348–358 (2015).
71. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 446–75 (2008).
72. Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 223–253 (2004).
73. Dung, N. T., Kim, J. M. & Kang, S. C. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 3632–9 (2008).
74. Kundu, A., Saha, S., Walia, S. & Kour, C. Antioxidant and antifungal properties of the essential oil of *Anisomeles indica* from India. *J. Med. Plants Res.* **7**, 1774–1779 (2013).
75. Singh, H. P. *et al.* Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT - Food Sci. Technol.* **48**, 237–241 (2012).

76. Ouariachi, E. M. El *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **4**, 281–286 (2014).
77. Erkan, N., Ayranci, G. & Ayranci, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* **110**, 76–82 (2008).
78. Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C. & Miguel, M. G. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind. Crops Prod.* **46**, 85–96 (2013).
79. Sacchetti, G. *et al.* Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* **91**, 621–632 (2005).
80. Milardović, S., Iveković, D. & Grabarić, B. S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry* **68**, 175–80 (2006).
81. Hammer, K. A., Carson, C. F. & Riley, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 985–90 (1999).
82. Chou, S.-T., Lai, C.-P., Lin, C.-C. & Shih, Y. Study of the chemical composition, antioxidant activity and anti-inflammatory activity of essential oil from *Vetiveria zizanioides*. *Food Chem.* **134**, 262–268 (2012).
83. Barley, C. *et al.* 大麦の炊飯香気の特徴に寄与する成分. 日本食品科学工学会誌 **60**, 59–62 (2013).
84. 辰朗大平, 直之松井, 俊彦金子 & 雄一田中. 効率的・効果的なマイクロ波減圧水蒸気蒸留法の開発 - スギ葉の精油成分の利活用に向けて. 森林総合研究所 研究成果選集

85. 正夫津嘉山, 貴啓佐々木, 幹二山本, 保彦河村 & 亮一市川. マイクロ波照射によるスダチ搾汁残渣中のフラボン成分の迅速抽出および有用物質への変換. 日本食品科学工学会誌 **57**, 427–433 (2010).
86. Danh, L. T., Mammucari, R., Truong, P. & Foster, N. Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil. *Chem. Eng. J.* **155**, 617–626 (2009).
87. Shan, B., Xie, J.-H., Zhu, J.-H. & Peng, Y. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. *Food Bioprod. Process.* **90**, 579–587 (2012).
88. Takemoto, A. & Itoh, S. Non-heating extractive from *Cryptomeria japonica* D. Don (Sugi) using the underwater shock wave. *Trans. Mater. Res. Soc. Japan* **32**, 1071–1073 (2007).
89. Manabe, H. *et al.* Efficient Improved Extraction of Tomato Saponin Using Shock Waves. *Chem. Pharm. Bull.* **59**, 1406–1408 (2011).
90. Maehara, H., Watanabe, T., Takemoto, A. & Itoh, S. A New Processing of Ginger Using the Underwater Shock Wave. *Mater. Sci. Forum* **673**, 215–218 (2011).
91. Takemoto, A. & Itoh, S. Research of essential oil extraction efficiency improvement from *Thujopsis dolabrata* var. *hondae* using the underwater shock wave. *Trans. Mater. Res. Soc. Japan* **36**, 7–10 (2011).
92. Takemoto, A. & Itoh, S. On the extraction possibility of the rushes (*Juncus effusus* L. var. *decipens* Buchen.) essential oil using the underwater shock wave. *Trans. Mater. Res. Soc. Japan* **35**, 951–953 (2010).
93. Otsuka, M., Maehara, H., Souli, M. & Itoh, S. Study on development of vessel for shock pressure treatment for food. *Int. J. Multiphysics* **1**, 69–84 (2007).
94. 井山裕文 & 比嘉吉一. 衝撃波を利用した食品加工装置の最適化. 浦上財団研究報告書 **20**, 1–10 (2013).

95. Kuraya, E., Takemoto, A. & Itoh, S. Improving the efficiency of essential oil extraction from shell ginger (*Alpinia zerumbet*) with an underwater shock-wave pretreatment. *Int. Symp. Essent. Oils* **8-11 Sep**, 43–44 (2013).
96. 外間宏三. On the Essential Oil in the Leaves of *Alpinia speciosa* K. Schum. 月桃の葉の精油成分について. *Bull. Arts Sci. Div. Univ. Ryukyus* **8**, 65–76 (1965).
97. 池間洋一郎 & 照屋輝一. ゲットウ葉の精油成分. 沖縄県工業試験所業務報告 **15**, 75–79 (1987).
98. 池間洋一郎, 島袋勇 & 照屋輝一. ゲットウ葉精油の分離条件の検討. 沖縄県工業試験所業務報告 **15**, 69–73 (1987).
99. 池間洋一郎, 城間美香 & 照屋輝一. 南大東島産ゲットウ葉精油の構成成分及び抗カビ性について. 沖縄県工業試験所業務報告 **16**, 143–149 (1988).
100. 池間洋一郎 & 照屋輝一. ゲットウ根茎に含まれる抗カビ成分の性質及び分離条件の検討. 沖縄県工業試験所業務報告 **18**, 44–48 (1990).
101. 池間洋一郎, 比嘉三利. バイオマス資源からの有用物質の分離・精製技術. 沖縄県工業技術センター研究報告書 **20**, 1–9 (1992).
102. Cavalcanti, B. C. *et al.* Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H₂O₂-induced DNA damage in cultured human leukocytes. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 4051–61 (2012).
103. Chompoo, J., Upadhyay, A., Kishimoto, W., Makise, T. & Tawata, S. Advanced glycation end products inhibitors from *Alpinia zerumbet* rhizomes. *Food Chem.* **129**, 709–715 (2011).
104. Upadhyay, A., Chompoo, J., Taira, N., Fukuta, M. & Tawata, S. Significant Longevity-Extending Effects of *Alpinia zerumbet* Leaf Extract on the Life Span of *Caenorhabditis elegans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**, 217–223 (2013).

105. Fernandez-Orozco, R., Roca, M., Gandul-Rojas, B. & Gallardo-Guerrero, L. DPPH-scavenging capacity of chloroplastic pigments and phenolic compounds of olive fruits (cv. Arbequina) during ripening. *J. Food Compos. Anal.* **24**, 858–864 (2011).
106. 田中亮一. クロロフィルおよびクロロフィル代謝経路中間体の抽出・定量法. 低温科学 **67**, 315–325 (2009).

謝 辞

本論文は平成23年度から平成27年度までの熊本大学大学院自然科学研究科博士後期課程在籍時に遂行した研究成果に基づいて構成されたものです。本研究を進めるにあたり、就学の許可ならびに衝撃波処理に関する多大なご指導、ご助言を頂きました沖縄工業高等専門学校 伊東繁 前校長（現名誉教授）ならびに屋良朝康 技術長に深く感謝の意を表します。

本研究をまとめるあたり、多大なるご指導を頂き、素晴らしい研究環境を提供して頂いた指導教員の國武雅史 教授に心から感謝の意を表します。また、広い視点でご指導、ご助言頂いた坂田雅代 准教授、現香川大学 上村忍 講師に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり F—ECR 電極を提供していただくとともに、多大なご指導、ご助言を頂いた国立研究開発法人 産業技術総合研究所の丹羽修 博士、加藤大博士に心から感謝申し上げます。

本論文の執筆にあたり、研究指導委員としての的確なご指導とご助言を頂きました井原敏博 教授、町田正人 教授、西山勝彦 准教授ならびに佐々木満 准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり電子顕微鏡観察、ORAC Assay、DPPH Assay ならびに LC-MS 測定など多大な協力をいただいた沖縄工業高等専門学校の渡邊謙太氏、技術補佐員の仲田志奈氏、久保田恵氏、當山瑛子氏に心から感謝申し上げます。

また、本研究室で三年間、多大なご助言と有意義なディスカッションをさせて頂いた坂田耕平氏ならびに長友祥太氏に深く感謝いたします。最後に、本研究を進めるにあたり、経済的負担を惜しむことなく温かく見守ってくれた家内をはじめ家族に深く感謝致します。