

Folin-Ciocalteu 法によるマタタビ属果実の 総ポリフェノール量測定における還元物質の影響

山 中 美 穂 大 田 忠 親 西 山 一 朗

Influence of Reducing Substances on Determination of Total Polyphenols in the Fruit of *Actinidia* Species by the Folin-Ciocalteu Assay

Miho YAMANAKA Tadachika OOTA Ichiro NISHIYAMA

1. 緒言

ポリフェノールは植物に広く分布する成分の一つであり、その数は数千種にも及ぶといわれている¹⁾。抗酸化作用により癌や動脈硬化等の生活習慣病の予防効果が期待される他、抗菌作用、抗腫瘍作用、抗アレルギー作用等様々な生理活性を持つものもあることから、食品中のポリフェノールは近年注目を集めている²⁾。そのため、食品中の総ポリフェノール量は、食品の機能性を評価するための指標として重要であると考えられる。

総ポリフェノール量の測定方法としては、Folin-Denis 法³⁾を応用した Folin-Ciocalteu 法⁴⁾が一般的に用いられる。この測定法は、ポリフェノールのフェノール性水酸基がアルカリ条件下で示す還元力によってモリブデン酸が還元されて生じる青色を、725~760 nm の吸光度により比色定量するものである。Folin-Ciocalteu 法は、未知の成分を含む総ポリフェノールの定量を迅速かつ高感度で行うことができるという大きな利点を有している。しかしその反面、試料中にポリフェノール以外の還元物質が共存する場合にはその影響を受け、総ポリフェノール量を過大評価する危険性がある。

キウイフルーツやサルナシ等のマタタビ属果実は、ビタミン C⁵⁾⁶⁾ や還元糖⁷⁾ を豊富に含むことが報告されている。そのため、これらの果実に含まれる総ポリフェノール量を Folin-Ciocalteu 法にて評価する場合には、夾雑還元物質の影響が懸念される。本研究では、Folin-Ciocalteu 法に対するアスコルビ

ン酸 (ビタミン C) 及び還元糖であるグルコースやフルクトースの影響を調べ、より実態に近い総ポリフェノール量の評価方法について検討を行った。

2. 実験方法

標準物質としては、没食子酸 (和光) を用いた。これを 80% メタノールに溶解し、0.05~0.2 mg/ml の標準溶液を作製した。この標準溶液 0.25 ml に、純水 3.75 ml 及び Folin-Ciocalteu 試薬 (SIGMA) 0.25 ml を加え混和した後、10% Na₂CO₃ 溶液 0.75 ml を加え全量 5.0 ml とした。よく混和した後、室温で 30 分間放置し、760 nm における吸光度を測定した⁴⁾⁸⁾。

総ポリフェノールを測定するための試料調製法としては、例えば可食部 10 g を採取し、抽出液によって抽出を行い、最終的に 100 ml に定容するなどの方法が一般的である。キウイフルーツやサルナシ等マタタビ属果実には可食部 100 g 中、およそ 15~200 mg のアスコルビン酸が含まれ⁵⁾、また、グルコースは 0.75~4.5 g、フルクトースは 0.85~4.2 g 含まれている⁷⁾。これらの果実から上記の方法でポリフェノールを抽出した場合、試料液中にはアスコルビン酸が最大約 0.2 mg/ml、グルコース及びフルクトースがそれぞれ約 5 mg/ml の濃度で共存する可能性がある。以上の試算をもとに、0.05~0.2 mg/ml アスコルビン酸 (和光)、2~5 mg/ml グルコース (SIGMA) 及び 2~5 mg/ml フルクトース (SIGMA) の溶液をそれぞれ調製し、Folin-

Ciocalteu法による吸光度を測定した。

また、各濃度の没食子酸標準溶液に、アスコルビン酸 (0.1及び0.2mg/ml)、グルコース (5 mg/ml) 及びフルクトース (5 mg/ml) を加え、共存する場合の吸光度を測定した。

3. 実験結果と考察

1) 検量線の作成

没食子酸を標準物質として、Folin-Ciocalteu法による検量線を作成したところ、0.05~0.2mg/mlの範囲で直線性が認められた (図1)。このときの決定係数は0.9993であり、没食子酸と吸光度の間には非常に強い比例関係が確認された。

2) 還元糖の影響

マタタビ属果実由来の総ポリフェノール測定用試料を想定したグルコース及びフルクトース濃度 (各2~5mg/ml) で、Folin-Ciocalteu 試薬による呈色があるかどうか調べたところ、いずれの還元糖もほとんど呈色が認められなかった (データは示していない)。これらの糖質の濃度を、試料液中想定最大濃度の20倍に相当する100mg/mlまで高めた場合でも、呈色はわずかであった。同濃度で比較すると、グルコースよりもフルクトースの方が濃く発色したが、100mg/mlのフルクトースの発色から換算される試料液中想定最大濃度の没食子酸相当量は、わずかに0.01mg/gに過ぎなかった。

次に没食子酸と還元糖が共存する場合のFolin-Ciocalteu 試薬による呈色を調べた。各濃度の没食

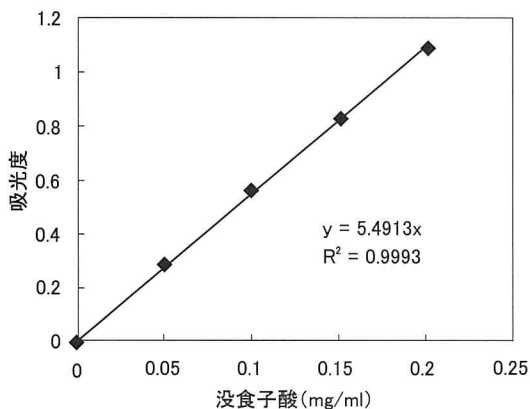


図1 没食子酸検量線

没食子酸標準溶液をFolin-Ciocalteu法に供し、その濃度と760 nmにおける吸光度との関係をプロットした。

子酸標準液に、グルコース及びフルクトースをそれぞれ5mg/mlの濃度で添加したところ、これらを添加しない場合の検量線とほぼ同等の直線が得られた (図2)。

以上の結果から、Folin-Ciocalteu法によるマタタビ属果実中総ポリフェノールの測定に対する還元糖の影響はごくわずかであり、実質的には無視できるものと考えられた。

3) アスコルビン酸の影響

マタタビ属果実由来の総ポリフェノール測定用試料を想定したアスコルビン酸濃度 (0.05~0.2mg/ml) でFolin-Ciocalteu 試薬による呈色があるかどうか調べたところ、明らかな呈色が認められた。このとき、アスコルビン酸濃度と吸光度の間には、非常に高い比例関係が見られた (図3)。

次に没食子酸とアスコルビン酸が共存する場合のFolin-Ciocalteu 試薬による呈色を調べた。各濃度の没食子酸標準液に、アスコルビン酸を0.1mg/ml及び0.2mg/mlの濃度で添加したところ、没食子酸及びアスコルビン酸に由来する吸光度は相加的であることが確認された (図4)。

以上の結果より、Folin-Ciocalteu法によってマタタビ属果実中総ポリフェノールを測定する場合には、アスコルビン酸の影響が非常に大きいことが示唆された。ただし、このアスコルビン酸の発色は、その濃度に比例しており、またポリフェノールによ

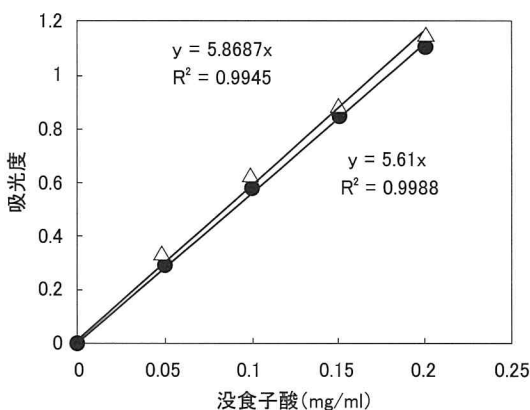


図2 還元糖の影響

それぞれの濃度の没食子酸標準溶液に、5mg/mlのグルコース (●) あるいは5mg/mlのフルクトース (△) を共存させ、Folin-Ciocalteu法に供し、760 nmにおける吸光度を測定した。

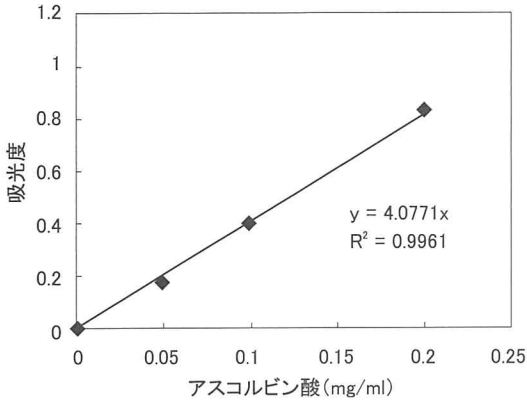


図3 アスコルビン酸の発色

アスコルビン酸溶液を試料液として Folin-Ciocalteu 法に供し、760 nm における吸光度を測定した。

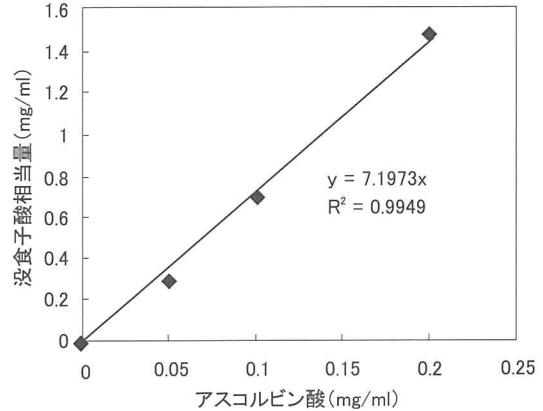


図5 アスコルビン酸と没食子酸相当量との関係

Folin-Ciocalteu 法におけるアスコルビン酸の発色から、アスコルビン酸と没食子酸相当量との関係をプロットした。

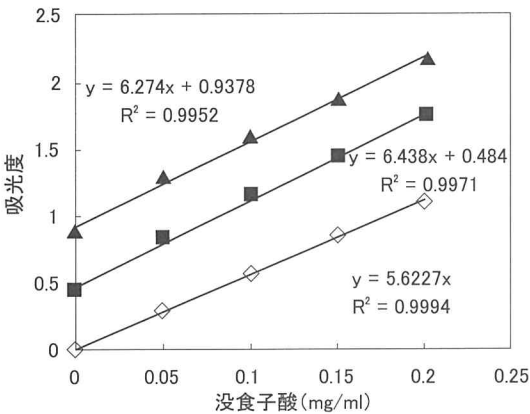


図4 アスコルビン酸の影響

それぞれの濃度の没食子酸標準溶液に、0 mg/ml (◇)、0.1 mg/ml (■) あるいは0.2 mg/ml (▲) のアスコルビン酸を共存させ、Folin-Ciocalteu 法に供し、760 nm における吸光度を測定した。

る発色と相加的であるため、Folin-Ciocalteu 法によって得られた総ポリフェノール量からアスコルビン酸のポリフェノール相当量を差し引くことによって、補正することが可能だと考えられた。

アスコルビン酸濃度と没食子酸相当量との関係を図5に示す。これにより、アスコルビン酸濃度に対する没食子酸相当量が算出できる。高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法等により共存するアスコルビン酸濃度を別途測定し、Folin-Ciocalteu 法によって得られた試料の没食子酸相当量からアスコルビン酸の没食子酸相当量を差し引いて補正することによ

って、より実態に近いマタタビ属果実の総ポリフェノール量が求められるものと考えられる。

一般に果実等の総ポリフェノールを抽出して Folin-Ciocalteu 法により測定する場合、抽出液中に共存するアスコルビン酸を考慮していない場合が多い。しかし、本実験の結果が示すとおり、アスコルビン酸に由来する発色の影響は非常に大きいため、これを考慮しない場合には、総ポリフェノール量を数倍程度まで過大評価する危険性がある。特にキウイフルーツやサルナシ等のマタタビ属果実のほか、アセロラ、グアバ、柿、レモン、いちご、オレンジ、パパイヤ等のビタミンCに富む果実のポリフェノール量を測定する場合には、注意が必要であろう。

試料作製過程でアスコルビン酸が酸化され、還元力を失う可能性も考えられるが、ポリフェノール測定用試料を調製する場合には、メタノールやアセトンなどの有機溶媒を用いるため、アスコルビン酸オキシダーゼ等の酵素は速やかに失活し、酵素的分解はほとんどないと考えられる。また、果実類は一般に有機酸を豊富に含むため、抽出液は酸性を呈する。そのため、アスコルビン酸の非酵素的分解も低く抑えられると推測される。以上のことから、ビタミンCを豊富に含む食品のポリフェノール測定では、アスコルビン酸に対する考慮が必須であると考えられる。

一部の報告では、固相抽出カラム等を用いてポリフェノール抽出液からアスコルビン酸を除去した後に、Folin-Ciocalteu 法により総ポリフェノール量

を測定している⁹⁾。しかしこの方法では、最初に抽出液からメタノール等の有機溶媒を除去する前処理が必要となるため、操作が煩雑になる上、回収率の問題が生じる。さらに、すべてのポリフェノールが固相カラムに吸着される保証がなく、また、ここでも回収率の問題が生じる。

これに対して、試料中のアスコルビン酸を測定して、そのポリフェノール相当量を差し引く方法では、ポリフェノール測定用の試料をそのままアスコルビン酸の測定に使用するため、前処理を要さず回収率の問題が生じない。また、アスコルビン酸の定量をHPLC法によって行えば、操作が容易なため多検体の測定にも適用可能である。そのため、この“差し引き法”による総ポリフェノール量の測定は、ビタミンCを豊富に含む食品に対する優れた評価法であると考えられる。今後この測定法を用いて、キウイフルーツやサルナシの種々の品種について、果実中総ポリフェノール量の評価を行う予定である。

4. 要約

総ポリフェノール量の測定法として一般的であるFolin-Ciocalteu法は、共存する還元物質の影響を受けると考えられる。そこで、還元性を持つアスコルビン酸や還元糖であるグルコース及びフルクトースが共存する場合、どの程度影響を受けるか検討を行った。還元糖はほとんど呈色せず、影響はごくわずかであると考えられた。一方、アスコルビン酸はFolin-Ciocalteu試薬で明瞭に青色を呈し、その濃度と吸光度の間には高い比例関係がみられた。また、標準物質の没食子酸と共存した場合でも、吸光度は相加的であった。

以上のことから、マタタビ属果実のようにビタミンCを豊富に含む食品の総ポリフェノール量を測定する場合、アスコルビン酸濃度を別途測定し、Folin-Ciocalteu法によって得られた没食子酸相当量から差し引いて補正することにより、より実態に

近い総ポリフェノール量が求められると考えられる。

引用文献

- 1) Cheynier, V. : Polyphenols in foods are more complex than often thought. *J. Am. Clin. Nutr.*, **81**, 223S-229S (2005)
- 2) Scalbert, A., C. Manach, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez : Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45**, 287-306 (2005)
- 3) Folin, O. and W. Denis : On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*, **2**, 239-243 (1912)
- 4) Singleton, V. L. and J. A. Rossi Jr. : Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144-158 (1965)
- 5) Nishiyama, I., Y. Yamashita, M. Yamanaka, A. Shimohashi, T. Fukuda and T. Oota : Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other *Actinidia* Species. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5472-5475 (2004)
- 6) Nishiyama, I. : Fruits of the *Actinidia* genus. *Adv. Food Nutr. Res.*, **52** (2007,印刷中)
- 7) 西山一郎, 福田哲生, 大田忠親 : キウイフルーツ等マタタビ属果実における糖質及び糖アルコール組成の品種/系統間差異, 園学雑, **74** (別冊2), 338 (2005)
- 8) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編 : 「食品機能研究法」光琳, 320-322 (2000)
- 9) George, S., P. Brat, P. Alter and M. J. Amiot : Rpid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derive products. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1370-1373 (2005)