

流れ分析による食品中の総ポリフェノール定量

高知大学農学部 島村智子

1. はじめに

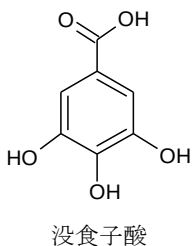
フェノール性水酸基を複数有する化合物をポリフェノールと総称し、古くから抗酸化活性を有する化合物群として広く知られている。これらは、カフェイン酸、クロロゲン酸などのフェノール酸、カテキン、ケルセチンなどのフラボノイド類、レスベラトロールのようなスチルベン、及びリグナンなどに分類される。ポリフェノールについては、先に示した抗酸化活性に加え、抗菌活性、抗アレルギー作用、抗炎症作用など様々な機能が明らかとされており、食品中の代表的な機能性成分の一つであると言える。

一方、2015 年 4 月に新たな機能性表示食品制度がスタートし、従来の特定保健用食品（トクホ）制度では表示することが困難であった機能性表示が一定の条件を満たすことにより可能となった¹⁾。ポリフェノールの機能性については *in vitro*、*in vivo* の両方において過去の研究例が豊富であることから、今後はポリフェノールが関与成分となる機能性表示食品の開発がより一層進むものと予想される。従って、ポリフェノールの検出・定量法は食品の品質管理や機能性の把握といった点において重要な役割を担うこととなる。

ポリフェノールの分析法には、総ポリフェノール定量法と HPLC などを用いる個別定量法がある。今回は、総ポリフェノール定量法に焦点を当て解説する。

2. バッチ法

総ポリフェノール量の測定法として一般的に用いられるものとしては、いずれも分光学的分析法であるフォーリン・チオカルト（Folin-Ciocalteu）法、フォーリン・デニス（Folin-Denis）法、酒石酸鉄吸光度法が挙げられる。中でも、汎用されているフォーリン・チオカルト法は、茶葉や茶飲料の総ポリフェノール量の分析法として ISO の公定法（ISO:14502-1:2005）にもなっており、タングステン酸、モリブデン酸、リン酸などからなるフォーリン試薬（フェノール試薬）がフェノール性水酸基により還元されて青色に呈色することを利用した方法である。右に示した没食子酸を標準物質として用いることが多く、その場



合、測定試料中に含まれる総ポリフェノール量を没食子酸当量で表す²⁾。バッチ法の反応時間は 1 時間以上と長いが、近年報告されたマイクロプレート法では、反応時間を 3 分にまで短縮することに成功している³⁾。

2. 流れ分析

2-1 吸光光度法

前述のフォーリン・チオカルト法は早くから流れ分析への展開が行われ、FIA 法^{4, 5)}、Multi-syringe FIA 法⁶⁾、SIA 法⁷⁾ の報告がなされている。いずれもワイン、ビール、茶、果汁中の総ポリフェノール量への適用性が確認されている。フォーリン・チオカルト法により求められた総ポリフェノール量は抗酸化活性値とよく相関することから、総ポリフェノール量を抗酸化活性指標として用いる場合もある。一方で、フォーリン・チオカルト法はアスコルビン酸や糖類など還元性物質との反応も生じることから、概して各種ポリフェノール類の個別定量値の合計より高い値を示す傾向にある点に注意が必要である。

2-2 化学発光法

総ポリフェノール定量に対する化学発光法の利用はバッチ法では皆無であるが、流れ分析においては多数の報告が存在する。2010 年以降においても、ルミノール-H₂O₂-ペルオキシダーゼ系⁸⁾、Mn(IV)-ホルムアルデヒド系⁹⁾、Mn(IV)-ホルムアルデヒド-ヘキサメタリン酸塩系¹⁰⁾、Ce(IV)-ローダミン 6G 系¹¹⁾ を利用した化学発光に基づく流れ分析（FI-CL）が提案され、ワイン、茶、果汁、及び植物抽出液中の総ポリフェノール定量への適用性が確認されている。しかし、さらに過去の報告と併せると化学発光試薬、酸化剤、発光促進剤等の組み合わせは多様であり、混沌とした状況にあった。Nalewajko-Sieliwoniuk らは、ごく最近、同一の FIA 装置を用い、下記に示したルミノール系、マンガン系、セリウム系の計 17 種類の化学発光に基づく総ポリフェノール定量法の各種ポリフェノール化合物（没食子酸、カフェイン酸、カテキン、ケルセチン、ルチン）に対する検出感度の比較を行うという興味深い評価研究を実施した¹²⁾。

ルミノール系 (5 種類)

ルミノール- I_2 、ルミノール- $K_3Fe(CN)_6$ 、ルミノール- H_2O_2 、ルミノール-金属イオン ($Co(II)$ 、 $Mn(II)$ 、 $Fe(II)$ 、 $Cu(II)$)、ルミノール- H_2O_2 -ペルオキシダーゼ

マンガン系 (8 種類)

$KMnO_4$ -ホルムアルデヒド、 $KMnO_4$ -ホルムアルデヒド-三リン酸塩、 $KMnO_4$ -ホルムアルデヒド-ヘキサメタリン酸塩、 $KMnO_4$ - Na_2SO_4 -ヘキサメタリン酸塩、 $Mn(IV)$ -ホルムアルデヒド、 $Mn(IV)$ -ホルムアルデヒド-三リン酸塩、 $Mn(IV)$ -ホルムアルデヒド-ヘキサメタリン酸塩、 $Mn(IV)$ -ギ酸-ヘキサメタリン酸塩

セリウム系 (4 種類)

$Ce(IV)$ - H_2SO_4 -ローダミン 6G、 $Ce(IV)$ - H_2SO_4 -ローダミン B、 $Ce(IV)$ - H_2SO_4 -Tween 20、 $Ce(IV)$ - H_2SO_4 -キニーネ

その結果、セリウム系の FL-CL は概して 5 種類のポリフェノール化合物に対する検出感度が低かったのに対して、ルミノール系ではルミノール- I_2 系¹³⁾が、マンガン系では $Mn(IV)$ -ホルムアルデヒド-ヘキサメタリン酸塩系¹⁰⁾が高い検出感度を示すことが判明した。さらに、繰り返し精度、再現精度、妨害物質の影響を比較し、Nalewajko-Sieliwoniuk ら¹²⁾は FL-CL においては、 $Mn(IV)$ -ホルムアルデヒド-ヘキサメタリン酸塩系が食品中の総ポリフェノール定量に最も適していると判断した。この場合の没食子酸に対する検出限界は $0.02 \mu g L^{-1}$ であり、フォーリン・チオカルト法に基づく Multi-syringe FIA 法の検出限界 $0.6 mg L^{-1}$ ⁶⁾と比較して 30000 倍高い検出感度を示した。また、 $Mn(IV)$ -ホルムアルデヒド-ヘキサメタリン酸塩系で定量を行った各種飲料中の総ポリフェノール量は抗酸化活性値 (DPPH ラジカル消去活性、ABTS ラジカル消去活性)とも良好な直線性を示したことから、実用性の面においても問題ないものと考えられた。

3. おわりに

各種食品中の総ポリフェノール量は品質管理や機能性評価の観点において、重要な指標の一つである。現在は主にバッチ法による測定が行われているが、機能性成分のスクリーニング、製品の日常的な品質管理においては、効率化、省力化、低コスト化を視野に入れた場合、流れ分析の需要が高まる可能性が高い。その場合、妨害物質の影響や検出限界など各

種流れ分析の特徴を把握し、適切な系を選択する必要があると考える。

参考文献

- [1] 池田秀子, 脂質栄養学, **24**, 9 (2015).
- [2] 日本食品科学工学会, 食品分析研究会編, 新・食品分析法[Ⅱ], 光琳, p. 68 (2006).
- [3] L.M. Magalhães, F. Santos, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, *Talanta*, **83**, 441 (2010).
- [4] M. Celeste, C. Tomás, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta.*, **269**, 21 (1992).
- [5] E. Mataix, M.D. Castro, *Analyst*, **126**, 251 (2001).
- [6] L.M. Magalhães, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5241 (2006).
- [7] C.L. Moreno, P.C. Runder, J.M.C. García, J.M.C. Pavón, *Microchim. Acta.* **148**, 93 (2004).
- [8] A.R.T.S. Araujo, F. Maya, M.L.M.F.S. Saraiva, J.L.F.C. Lima, J.M. Estela, V. Cerdà, *Luminescence*, **26**, 571 (2011).
- [9] E. Nalewajko-Sieliwoniuk, I. Tarasewicz, A. Kojło, *Anal. Chim. Acta.*, **668**, 19 (2010).
- [10] J. Malejko, E. Nalewajko-Sieliwoniuk, J. Nazaruk, J. Siniło, A. Kojło, *Food Chem.*, **152**, 155 (2014).
- [11] E. Nalewajko-Sieliwoniuk, J. Nazaruk, J. Kotowska, A. Kojło, *Talanta*, **96**, 216 (2012).
- [12] E. Nalewajko-Sieliwoniuk, J. Malejko, M. Świączkowska, A. Kowalewska, *Food Chem.*, **176**, 175 (2015).
- [13] E. Nalewajko-Sieliwoniuk, J. Nazaruk, E. Antypuk, A. Kojło, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, 579 (2008).