酸素電極法による香辛料の酸化防止効果の測定

(昭和 61 年 2 月 14 日受理)

平山 晃久* 山崎 真美* 渡辺 徹志*
小野真由美* 福井 昭三*

Measurement of Antioxidant Activity in Spices by an Oxygen Electrode Method

Teruhisa HIRAYAMA, Mami YAMAZAKI, Tetsushi WATANABE,
Mayumi ONO and Shozo FUKUI

(Kyoto Pharmaceutical University: 5-Nakauchi-cho, Misasagi,
Yamashina-ku, Kyoto, Japan)

A simple and rapid determination method for antioxidant activity by using an oxygen electrode was developed. The procedure is as follows. Oil emulsion (1.2 ml), which contained 0.18 g of safflower oil, and 0.29 ml of Tween 20, was added immediately to 46.3 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2) in a 50 ml centrifuging tube. The contents of the tube were stirred continually and maintained at 45°C. Immediately after addition of the emulsion, 2.5 ml of hemin solution was added. The oxygen electrode was inserted quickly into the tube, and the oxygen uptake from the reaction solution was recorded automatically. The antioxidative effects of spices in this system were tested. Of 15 methanol extracts of spices tested, 7 were effective. The methanol extract of cinnamon (1% ethanol solution) had the greatest activity (induction period=49.8 min; 50% oxygen consumption period=69.8 min), where as the induction and 50% oxygen consumption periods of 1% butylated hydroxytoluene, used as a positive control, were 11.9 and 21.0 min, respectively.

(Received February 14, 1986)

Key words: 酸素電極法 oxygen electrode method; 酸化防止効果 antioxidative effect; 香辛料 spices; シナモン cinnamon; オールスパイス all spice

緒 言

現在食品に対する酸化防止剤としてジブチルヒドロキシトルエン (BHT), ジブチルヒドロキシシアニソール (BHA) などが使用されているが, これらは合成食品添加物であり, 特に BHA については一部で安全性に疑問も提起されており新たな酸化防止剤が望まれている. また現在使用されている α -tocopherol は酸化防止力としてはそれ程強力なものではなく, 新しい天然由来の酸化

防止剤の開発が急務である.

古来より香辛料はその香り, 味など食欲増進効果以外に魚肉, 畜肉類などの保存の目的でも使用されてきており, その抗菌効果以外にローズマリー¹⁾ などで実証されているように酸化防止効果も予想される.

また現在のところ, 酸化防止効果の測定法としては酸素の吸収量を測定する重量法²⁾, ワールブルグ検圧計を用いる酸素吸収法³⁾及び溶存酸素計を用いる測定法^{4)~6)}がある. これらのうち最も迅速簡便であり, 酸素吸収量の経時変化が容易に測定できる溶存酸素計を用いる方法

* 京都薬科大学: 京都市山科区御陵中内町 5

について検討した。溶存酸素計法としては Berner らの方法⁵⁾が報告されているが追試したところ再現性に乏しい結果が得られたので、反応容器、使用する油脂などを変えて一部改良し、再現性の良い測定法を確立できた。そこでこの方法を用いて入手できた香辛料十数種のメタノールエキスについて酸化防止効果の測定を行い、若干の知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 試 薬

紅花油、いわし油：山桂産業株式会社製

ごま油：半井化学薬品(株)製

ヘミン：hemin, bovine, Type 1 crystalline Sigma 社製

BHT, Tween 20：和光純薬工業(株)製試薬一級

BHA, α -tocopherol：半井化学薬品(株)製試薬一級

有機溶媒：市販試薬一級品を蒸留後使用

他の試薬は特級品をそのまま使用した。

香辛料：市販の粉末香辛料15種を用いた。ローレル、クローブ、シナモン、オールスパイス、セージ、タイム、カルダモン、ナツメグ、ブラックペパー、ホワイトペパー、サンショウ、クミンシード、ローズマリーはエスピー食品(株)製、オレガノとレッドペパーはライオン(株)製を用いた。

2. 装 置

スターラー：東京理化学器械製 Hotting stirrer

溶存酸素計：電気化学計器(株) DO-31 型

酸素電極：ロングライフ型溶存酸素電極 7612-5D 型

記録計：日本分光 RC-125M

3. 実験操作

試験溶液の調製：酸化防止効果判定のための対照試料として既存酸化防止剤である BHA, BHT 及び α -tocopherol を用い、試験対象としては下記のように調製した香辛料のメタノールエキスをを用いた。BHA, BHT 及び α -tocopherol はメタノールに溶解して 1% 及び 2% の溶液を作製した。香辛料は粉末試料 5 g を採りメタノール 50 ml を加え、水浴中 60° で 1 時間抽出を 2 回繰返し、抽出液を合して減圧下 40° 以下で濃縮乾固した。ここに得た抽出物をメタノールに溶解し 10% の試験溶液を作製した。

ヘミン溶液：Berner らの方法⁵⁾に従い、52 mg のヘミンを蒸留水 75 ml に懸濁し、10% 水酸化カリウム溶液 2~4 滴を加えて溶解し蒸留水を加えて 100 ml とした。

酸化防止効果測定：50 ml のビーカーにメタノールに溶解した試験溶液 0.1 ml、油脂 0.75 g 及び Tween 20 1.2 g を入れ、これに 45° に加温した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 3 ml を加え、20 ml の注射器を用いて約 20 回吸引、排出を繰返し均一に乳化させる。乳化後ただちに乳化液の 1.2 ml を採り、あらかじめ 50 ml の遠沈

Fig. 1. Apparatus for O₂ consumption method

Fig. 2. O₂ consumption curves of oil with and without antioxidant

A: oil

B: oil+antioxidants

a: induction period

b: 50% O₂ consumption period

管に 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 46.3 ml を入れ、液温を 45° に保ったものの中に加える (油脂濃度約 180 mg/50 ml 反応液)。ついでヘミン溶液 2.5 ml を一気に加え (ヘミン濃度 1.3 mg/50 ml 反応液)、ただちに Fig. 1 のようにヘッドスペース部及び電極部に空気が残留しないようにゴム栓付き酸素電極を挿入して密閉し、回転子で攪拌しながら溶存酸素濃度を測定し、レコーダーを用いて経時的に記録する。ただし酸素電極は測定前から 45° の水に浸し温度変化を与えないようにする。別に試験溶液のかわりにメタノール 0.1 ml を用い以下同様に操作して溶存酸素濃度を測定しブランク値とする。

結果と考察

酸素電極を用いる酸化防止効果測定法の検討

すでに Berner ら⁵⁾は測定懸濁液中の油脂含量、油脂と酸化触媒であるヘミンとの量関係及び七面鳥油を用いたときの反応温度などについて検討しており、これによる合成酸化防止剤の酸化防止効果を溶存酸素吸収開始時期すなわち誘導期を用いて測定している。そこで今回香

Fig. 3. O_2 consumption curves in various oils ($45^\circ C$)

辛料の酸化防止効果を知る目的で、反応溶液としては Berner らと同一組成のものを使用し、油脂の種類及び反応温度条件について検討を加えた。温度条件について 45° 以下での条件も検討したが、初期の溶存酸素濃度は高く感度は上がるが、逆に過酸化の速度が遅く長時間を要するため今回は反応温度を 45° に統一した。また Berner らの方法ではマイヤーフラスコを容器として用いているため、攪拌により空気中の酸素が反応溶液中へ再吸収され、追試の結果再現性が得られなかった。そこで Fig. 1 に示すように 50 ml の遠沈管を反応容器とし、酸素電極にゴム栓を取り付け空気の入らない、さらにヘッドスペースのない状態で実験を行ったところ再現性の高い結果が得られた。

Fig. 2 には本法で測定した典型的な油脂の過酸化による溶存酸素減少曲線 (A) を示してある。これに酸化防止剤を添加することによって誘導期の延長がみられ、ついで A と同様の酸素減少曲線を描くのが一般的である (B)。そこで今回は誘導期 a (min)、50% 酸素減少時間 b (min) 及び 50% 酸素減少時における酸素減少速度 c (O_2 ppm/min) の三者を指標として酸化防止効果を比較することとした。すなわち酸化防止剤の添加によって c は一定であるが、a 及び b の延長が見られると予想される。

実験に用いる油脂の選択

Fig. 3 にはいわし油、紅花油及びごま油を用いたときの対照の溶存酸素減少曲線を示す。いずれの場合も反応温度 45° における初期溶存酸素濃度は 7.0 ppm と安定していた。

不飽和高級脂肪酸の多いいわし油を実験用油脂とした場合、 $b=3$ min と酸素の減少が速くであり実験時間が短かくてすむ利点があるが、反面過酸化の過程が早過ぎて酸化防止剤の効果の判別が困難であった。半乾性油のごま油を用いた場合は $a=67$ min, $b=95$ min と長時間を要し実験用油脂として不適當であった。リノール酸を主構成脂肪酸とする紅花油は誘導期を持たず、 $b=9.0 \pm 1.0$ min ($n=3$), $c=2.01 \pm 0.35$ O_2 ppm/min ($n=3$) と

Table 1. Prolonged Effects of Antioxidants on O_2 Consumption by Safflower Oil at $45^\circ C$

Sample	a	b	c
Control	0	9.0	2.01
BHT 1%	11.5	21.0	1.17
2%	46.0	58.0	1.95
BHA 1%	12.0	26.5	1.56
2%	48.5	62.0	1.44
α -Tocopherol 1%	0	18.0	2.42
2%	0	24.5	1.73

a: induction period (min, mean value ($n=3$))

b: 50% O_2 consumption period (min, mean value ($n=3$))

c: O_2 consumption rate (O_2 ppm/min, mean value ($n=3$)) at 50% O_2 consumption period.

50% 酸素減少時間も適当であり、再現性も認められ実験用油脂としては最適と思われたので以後の実験にはすべて紅花油を用いた。

市販酸化防止剤の酸化防止効果

Table 1 には今回の酸素電極法による BHT, BHA 及び α -tocopherol のそれぞれ 1% 並びに 2% メタノール溶液 0.1 ml 添加による酸化防止効果測定結果を示している。BHA, BHT の c 値は対照に比べてそれ程変動はなかったが、a 値、b 値ともに濃度依存的に増加が認められた。また α -tocopherol については 1% 及び 2% 溶液ともに誘導期の形成 (a 値の増加) が認められず BHT, BHA に比べて酸化防止効果の弱いことが判った。

市販香辛料メタノールエキスの酸化防止効果

Table 2 には 15 種の市販香辛料のメタノールエキスの酸化防止効果を示した。Table 2-a に示した香辛料は a 値の増加が認められず b 値のわずかな増加あるいは減少が見られたものであり、これらには酸化防止効果はほとんどないものと考えられる。さらに対照の $b=9.0$ min に対してブラックペパーは 7.0 min、ホワイトペパーは 6.0 min と短かく、これらの成分中には過酸化

Table 2. Antioxidant Activities of Spices
Table 2-a

Sample*)	a	b	c
Sansho	0	15.5	1.85
Laurel	0	17.0	1.62
Nut meg	0	13.0	1.65
Cardamom	0	15.5	1.90
Red pepper	0	16.0	2.30
Black pepper	0	7.0	1.86
White pepper	0	6.0	2.31
Cumin seed	0	12.5	1.93

Table 2-b

Sample*	a	b	c
Cinnamon	49.8	69.8	1.94
Rosemary	9.5	32.5	1.56
Thyme	4.3	29.0	2.00
Clove	12.3	29.5	3.19
Oregano	6.0	26.0	1.75
Sage	4.5	22.5	1.94
All spice	19.0	62.8	0.81
Control	0	9.0	2.01

* 10% ethanol solution of methanol extract

a: induction period (min, mean value (n=3))

b: 50% O₂ consumption period (min, mean value (n=3))c: O₂ consumption rate (O₂ ppm/min, mean value (n=3)) at 50% O₂ consumption period.

を促進するか、あるいはそれ自体が酸素を消費する化合物の存在が示唆された。

Table 2-b には今回の実験で酸化防止効果の認められた 7 種の結果を示しているが、すでに活性酸素法⁷⁾、チオンアン酸鉄法⁸⁾を用いて酸化防止成分 rosmanol 及び carnosol を含有する事が報告されているローズマリー¹⁾は、今回の実験においてもかなりの酸化防止効果を示した。今回の実験で最も強い効果を有していたのはシナモンで a=49.8 min, b=69.8 min であった。

通常、酸化防止剤はラジカルのスカベンジャーとして働き、誘導期の延長効果を示すが、いったん過酸化の連鎖反応が始まるとそれを抑制する効果は少ないとされている。ところが今回の実験においてオールスパイスは誘導期 (a)=19.0 min と短かいにもかかわらず、50% 酸素減少時間 (b)=62.8 min とシナモンに次いで長い結果が得られ、さらに 50% 酸素減少時の酸素減少速度は対照の 2.01 ppm/min に比し 0.81 ppm/min とかなり遅いものであり、この事は連鎖反応を抑制していると考

えられる結果が得られ、他の香辛料とは異なり特異的な成分を含むと考えられる。今回酸化防止力の認められた数種の香辛料について、今後本法を応用しながら有効成分の検索を行う予定である。

要 約

酸素電極を用いる簡易酸化防止効果測定法を開発し、香辛料の酸化防止効果について検討した。

1. 50 ml 遠沈管を測定容器として用い、油脂には紅花油を用いヘミンを添加し、ヘッドスペースのない状態で酸素電極を挿入し、試験溶液中の溶存酸素の減少を経時的に測定することにより、信頼性の高い測定法に改良できた。測定値は誘導期 (min), 50% 酸素減少時間 (min) 及びそのときの酸素減少速度 (O₂ ppm/min) で表した。

2. 15種の市販香辛料のメタノール抽出物についてその酸化防止効果を測定したところ、8種は陽性対照として用いた 1% BHT (50% 酸素減少時間 b=21.0 min) より効果はなく、特にブラックペパー (b=7.0 min), ホワイトペパー (b=6.0 min) は対照の油脂のみ (b=9.0 min) より溶存酸素の減少が速く、これらの成分として酸化促進作用を有する化合物の含有が示唆された。

3. 有効であった 7 種のうち最も効果の強いものはシナモンで誘導期 a=49.8 min, b=69.8 min であった。また特異なものはオールスパイスで a=19.0 min と短いのに、b=62.8 min と長く、他の香辛料に比べて酸素減少速度が 0.81 ppm/min と遅い点であった。

文 献

- 1) Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H.: Agric. Biol. Chem. **47**, 521~528 (1983).
- 2) Olcott, H. S., Einsett, E.: J. Am. Oil Chem. Soc. **35**, 161~162 (1958).
- 3) 笹川泰治: “実験化学講座” **24**, 生物化学 II, 日本化学会編, p. 85~137 (1958) 丸善.
- 4) Cort, W. M.: Food Technol. **1974**, Oct. 60~66 (1974).
- 5) Berner, D. L., Conte, J. A., Beal, R. E.: J. Am. Oil Chem. Soc. **51**, 292~296 (1974).
- 6) Yagi, K.: Agric. Biol. Chem. **24**, 142~145 (1970).
- 7) Tentative method Cd-12-57, Am. Oil Chem. Soc.
- 8) Osawa, T., Namiki, M.: Agric. Biol. Chem. **45**, 735~739 (1981).