

ワインと各種飲料物の抗酸化能

石 沢 信 人, 杉 田 収,
斉 藤 秀 晃, 中 野 正 春

新潟県立看護短期大学

Antioxidant activity of wines and various beverages.

Nobuhito ISHIZAWA, Osamu SUGITA,
Hideaki SAITO, and Masaharu NAKANO

Summary We measured antioxidant activities of red and white wines, other various alcoholic and non-alcoholic beverages (beer, sake, Japanese tea, coffee, tea, and konbuocha) and some pure chemical compound solution by CHP/Hb·MB method. This is the method that measure the remaining CHP concentration after reducing reaction caused by adding specimen to CHP solution by a spectrum photometer.

We have conclusion as follows:

1. CHP/Hb·MB method can measure antioxidant activities in various beverages.
2. Wine is the alcoholic beverage which had high antioxidant activity.
3. Red wine contained high antioxidant activity than white wine, but white wine contained antioxidant activities high fully, too. So we need not to be concerned with red wine.

要 約 我々は、赤ワイン・白ワイン・その他のアルコール性飲料（ビール，日本酒）・非アルコール性飲料（日本茶，コーヒー，紅茶，昆布茶）および数種類の純化合物の抗酸化能を，CHP/Hb・MB法を用いて測定した。本法はCHP溶液への試料添加による還元反応後の残存CHP濃度を，分光光度計で測定するものである。

我々の得た結論は以下の3点である：

1. CHP/Hb・MB法は各種飲料物の抗酸化能を測定できる。
2. ワインは高い抗酸化能を有するアルコール性飲料である。
3. 赤ワインは白ワインよりも高い抗酸化能を示すが，白ワインにも高い抗酸化能が認められるので赤ワインにこだわる必要はない。

Key words クメンヒドロペルオキシド／ヘモグロビン・メチレンブルー法
(cumene hydroperoxide / hemoglobin · methylene blue method)
抗酸化能 (Antioxidant activity)
ワイン (wine)
アルコール飲料 (alcohol beverages)
非アルコール飲料 (non-alcohol beverages)

一般に赤ワインの飲用により血清抗酸化能が向上することがよく知られている¹⁾。しかし、白ワインについては抗酸化能がどの程度のものなのかはあまり論じられていない。白ワインにも抗酸化能があるのであれば、これを飲用すれば血清抗酸化能を向上させる事が可能なのではないかと考えられる。また、抗酸化物質を含む飲料物を常用することにより、血清抗酸化能を高い水準に維持できる可能性もある。

いずれにせよ、飲料物の抗酸化能を測定することは、活性酸素種が関連する疾患の予防や管理に際して、有用な知見を与えてくれることが期待できる。そこで、アルコール飲料（赤ワイン、白ワイン、ビール、日本酒）と非アルコール飲料（緑茶、ほうじ茶、紅茶、コーヒー）、純物質（亜硫酸ナトリウム、ケルセチン、アスコルビン酸、 α -トコフェロール）の *in vitro* での抗酸化能を測定したので結果を報告する。

測定方法

測定系は試薬にデタミナー-LPO（協和メディックス、表1）を用い、クメンヒドロペルオキシド（CHP）濃度を分光光度計で測定する杉田らの方法を用いた²⁾。

(1) 測定原理

ヒドロペルオキシド（Hydroperoxide）とメチレンブルー誘導体が、ヘモグロビン（Hb）を触媒として反応すると、メチレンブルー（MB）が等モル生成する（図1）。そこで、この反応による呈色度を測定することにより過酸化脂質の定量ができる。メチレンブルーの吸光度のピーク波長は675nmなので、この波長を用いて上記反応による呈色度を分光光度計により測定することにより、血清過酸化脂質を定量することができる。この測定方法をヘモグロビン・メチレンブ

ルー（Hb・MB）法という³⁾。

過酸化物質であるCHPと抗酸化能を有する試料を混合すると、CHPが還元される。そこで既知量のCHPとMB誘導体の反応から得られるMB量から、試料添加後の残存CHPとMB誘導体の反応から得られるMB量を引くことで、試料によって還元されたCHP量を定量でき、これをもって抗酸化能とする²⁾。この測定方法をクメンヒドロペルオキシド/ヘモグロビン・メチレンブルー法（CHP/Hb・MB法）と呼称した。

(2) 測定法

赤ワインを含む各種の飲み物の *in vitro* における抗酸化能を測定した。デタミナー-LPOの標準使用法と杉田らによるモディファイされた使用法の比較を表2に示す。ここに示すように、各種試料とCHPを混和して、残存したCHPを測定した。

表1 デタミナー-LPOキット構成

構成試薬名	容量・本数	成分名	含量（調整後）
試薬 1-A （前処理剤）	55mL用 1本	アスコルビン酸オキシダーゼ リボプロテインリパーゼ 安定化剤	14 単位/mL 1.3 単位/mL
試薬 1-B （前処理剤溶解液）	55mL 1本	グッド緩衝液（pH5.8） 界面活性剤	0.1M
試薬 2-A （発色剤）	110mL用 1本	10-N-メチルカルバモイル-3,7-ジメチルアミノ-10H-フェノチアジン（MCDP） 安定化剤	0.04mM
試薬 2-B （発色剤溶解液）	110mL 1本	グッド緩衝液（pH5.8） ヘモグロビン 界面活性剤	0.1M 67.5 μ g/mL
標準液	10ml用 1本	クメンヒドロペルオキシド水溶液	50.0nmol/mL

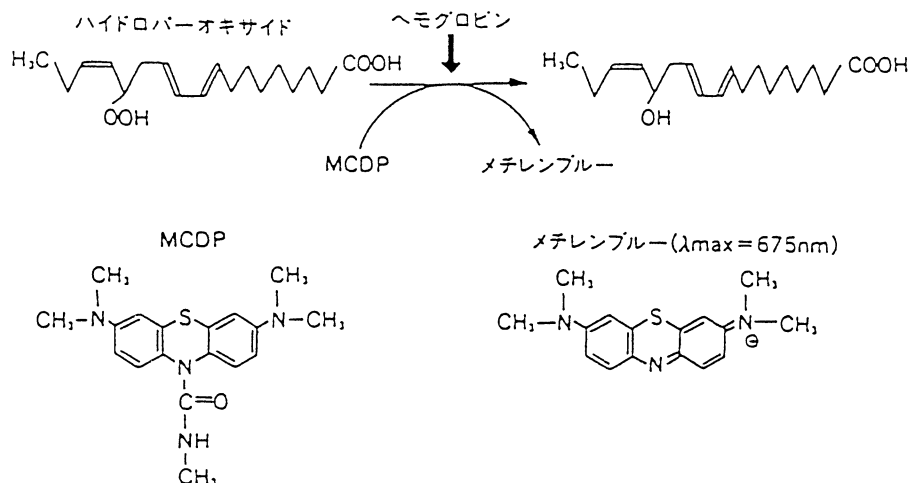


図1 ヒドロペルオキシドとメチレンブルー誘導体の反応

対照となる盲検用試料は蒸留水100 μ Lを用いた。標準用試料は50nmol/mlのCHP溶液70 μ Lと蒸留水30 μ Lを混合し、35nmol/mlのCHP溶液を調整した。各種試料をそれぞれ30 μ Lと50nmol/mlのCHP溶液70 μ Lを混合した。これらの試料を、30℃恒温槽内に2時間放置して、1.0mlの前処理液を添加・混和し、30℃恒温槽内に5分間放置して発色液を2.0ml添加・混和した。そして、30℃恒温槽内に10分間放置して分光光度計で波長675nmの吸光度を測定した。標準用試料の測定値がCHP35nmol/mlなので、これを基準に各測定値より残存するCHP濃度を求めた。このCHP濃度と標準用試料中のCHP濃度との差をもって各試料の抗酸化能とした。

試料と混和したCHPは35nmol/mlなので、この測定系において直接測定できる抗酸化能の上限値は35nmol/mlである。そこで、測定時に30nmol/ml以上の抗酸化能を示した試料については適宜蒸留水による希釈を行い再度測定して抗酸化能を計算した。

上記の方法に従い、アルコール飲料は赤ワイン（2銘柄；うち1銘柄は2ロット）、白ワイン（2銘柄；うち1銘柄は2ロット）、ビール（2銘柄）、日本酒（2銘柄）、非アルコール飲料はほうじ茶（3銘柄）、緑茶（17銘柄）、レギュラーコーヒー、紅茶、昆布茶（それぞれ1銘柄）、単離化合物は亜硫酸ナトリウム、ケルセチン、アスコルビン酸、 α -トコフェロール（それぞれ和光純薬工業株式会社から得た）について、それぞれの溶液の抗酸化能を測定した。ケルセチンと α -トコフェロールはメタノールで溶解し、亜硫酸ナトリウムとアスコルビン酸は蒸留水で溶解した。（表3）

表2 測定操作の比較

	標準法			モディファイ法		
	検体用	標準用	盲検用	検体用	標準用	盲検用
検体（試料）	100 μ L	—	—	30 μ L	—	—
標準液	—	100 μ L	—	70 μ L	70 μ L	—
蒸留水	—	—	100 μ L	—	30 μ L	100 μ L
前処理液	1.0mL			1.0mL		
第一反応	混和後に、30℃恒温槽内に2～5分間放置する			混和後に、30℃恒温槽内に5分間放置する		
発色液	2.0mL			2.0mL		
第二反応	混和後に、30℃恒温槽内に10分間放置する			混和後に、30℃恒温槽内に10分間放置する		
測定	盲検を対照として、波長675nmで吸光度を測定する			盲検を対照として、波長675nmで吸光度を測定する		

各試料の測定法

1. アルコール飲料

1) ワイン

ワインは、10倍希釈したものを試料として抗酸化能を測定した。

2) ビール

各銘柄とも缶ビールを用いた。試験管に入れて肉眼的に発泡が見られなくなるまで、サーモミキサーを用いて攪拌した後に試料として抗酸化能を測定した。

3) 日本酒

各銘柄ともそのまま試料として抗酸化能を測定した。

2. 非アルコール飲料

1) 日本茶

(1) ほうじ茶

茶葉2gに沸騰水100mlを加え、1分間放置した後20秒かけて容器に注ぎ、その抽出液を試料として抗酸化能を測定した。

(2) 緑茶

ほうじ茶と同じく茶葉2gに沸騰水100mlを加え、抽出時間は1分間放置し、20秒かけて容器に注いだ。緑茶については抽出液を濾紙により濾過した場合と濾過しなかった場合との両方で抗酸化能を測定した。また、湯の温度を60℃にして同様に抽出し、抗酸化能を測定した。

2) レギュラーコーヒー

グレコパックを使用した。1パックに7gのコーヒー豆がセットされていて、指示量の沸騰水130mlを用いて抽出した。

3) 紅茶

リプトン・ティパック1包を沸騰水200ml中に1分間放置してその抽出液の抗酸化能を測定した。

4) 昆布茶

昆布茶1包を沸騰水100mlで溶解し、濾紙を用いて濾過した。その濾液の抗酸化能を測定した。

3. 単離化合物

1) 亜硫酸ナトリウム

亜硫酸ナトリウムは、25.0mg/dlと12.5mg/dlの2

濃度における抗酸化能を測定した。

2) ケルセチン

2.1 μ mol/mlの濃度までの4濃度における抗酸化能を測定した。

3) アスコルビン酸

400nmol/mlの濃度までの4濃度における抗酸化能を測定した。

4) α -トコフェロール

11.9 μ mol/mlの濃度までの4濃度における抗酸化能を測定した。

結果

今回我々が用いた測定系では、ワインが際立って高い抗酸化能を示した。その数値は、抗酸化能が高いと言われる緑茶、その他の非アルコール飲料の10倍前後であった。赤ワインと白ワインの間では、赤ワインの方が若干高い抗酸化能を示したが、白ワインのそれも他の試料に比べれば十分に高い数値を示した。また、ビールは緑茶と同程度の抗酸化能を示したが、日本酒は抗酸化能を持たなかった(表4)。

純物質では亜硫酸ナトリウムが強い抗酸化能を示した。図2にアスコルビン酸と α -トコフェロールの濃

度と抗酸化能の関係を示した。同様にケルセチンは、我々の測定系で検知できた。図3にはケルセチンの濃度と抗酸化能の関係を示した。

考察

ワインの中に含まれる種々の抗酸化物質は、葡萄の実に由来するものと考えられる⁴⁾。赤ワインが白ワインよりも高い抗酸化能を示したことは、植物の抗酸化物質であるポリフェノール類が果実の皮に多く含まれることと関連があると考えられる。一方で、白ワインが赤ワインよりも高い抗酸化能を示すとの報告⁵⁾もあり、ポリフェノール類だけではワインの抗酸化能を説明しきれないものと考えられる。

日本酒が抗酸化能を示さなかった事は、抗酸化能を有する物質が米の表面付近に局在することを示唆すると思われる。仕込みの段階で酒米は表面を十分に研磨されるので、米が持っているかもしれない抗酸化物質を除去されて醸造される

表3 使用した飲料

種別	銘柄	
ワイン	赤ワイン	岩の原ワイン菊水印
		たいないワイン
	白ワイン	岩の原ワイン菊水印
		たいないワイン
ビール	アサヒスーパードライ生	
	キリン一番搾り生	
日本酒	朝日山	
	ワンカップ大関	
日本茶	ほうじ茶	京錦
		宇治錦
		峰錦
	緑茶	五月晴
		上芽茶
		かりがね
		玉露粉
		あら茶
		わらかけ玉しぶき
		天下一
		ふかむし天下一
		甘露
		玉露芽
		玉露かりがね
		利休
		深むし利休
		玉露翠峯
		大走り新茶
		特選玉翠
玉露玉かつら		
レギュラーコーヒー	グレコパック	
紅茶	リプトン・ティパック	
昆布茶		
単離化合物	亜硫酸ナトリウム	
	ルチン	
	ケルセチン	
	アスコルビン酸	

表4 CHP/HB・MB法による酒類、コーヒー、お茶の抗酸化能

種別	抗酸化能 (nmol/mL)	調整法	サンプル数
赤ワイン	172-267		n=3
白ワイン	147-214		n=3
ビール	12.3-17.0		n=2
日本酒	0		n=2
コーヒー	23.6	7g/130mL	n=1
緑茶	16.8-27.8	2g/100mL	n=17
ほうじ茶	11.8-17.3	2g/100mL	n=3
紅茶	5.5	1包/200mL	n=1
昆布茶	0	1包/100mL	n=1

のであろう。そのために、日本酒は抗酸化能を持たないものと考えられる。

ビールについては、大麦やホップの実を入れて醸造されるので、これらのもつ抗酸化物質が製品中に溶解しているものと考えられる。そのために抗酸化能を示したと考えられる。

緑茶については、その抗酸化能の主体がアスコルビン酸によって担われていると考えられるが、その他のポリフェノール類が関与していることも十分考えられる。ほうじ茶が緑茶に比べて低い抗酸化能を示したこ

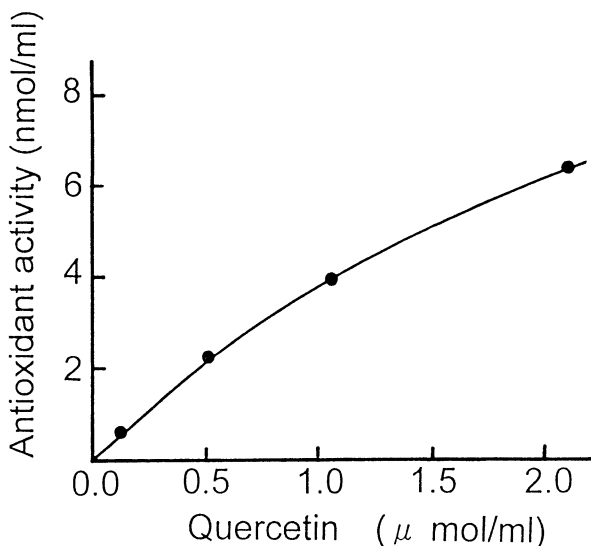


図2 α-トコフェロールとアスコルビン酸の抗酸化能

とは、焙じる時に加えられる熱によるアスコルビン酸の破壊によるものではないかと考えられる。

亜硫酸ナトリウムはわれわれの測定系において著しい抗酸化能を示した。これは、大気中の酸素からワインの品質を保持するために添加されているものである。ワインに残存していた遊離亜硫酸ナトリウム量(10~40ppm)と、総亜硫酸ナトリウム量(33~144ppm)とが、それぞれのワインの抗酸化能とは比例せず無関係であることから、ワインの抗酸化能は亜硫酸ナトリウムによるものではないと考えた。

ケルセチンは蒸留水で加温・攪拌したがほとんど溶解させられなかった。メタノールを用いたところ蒸留水に比べて溶解が容易であった。このことから、ワインの抗酸化能はアルコールの存在により溶解しやすいポリフェノールが関与していることが示唆される。また、ケルセチンは、通常ワインに含まれるとされる濃度⁵⁾では抗酸化能があると明確にはいいきれない。しかし、これはワインに含まれるポリフェノール類の一つに過ぎず、我々の測定系で抗酸化能を検知できたことから、ワインの全抗酸化

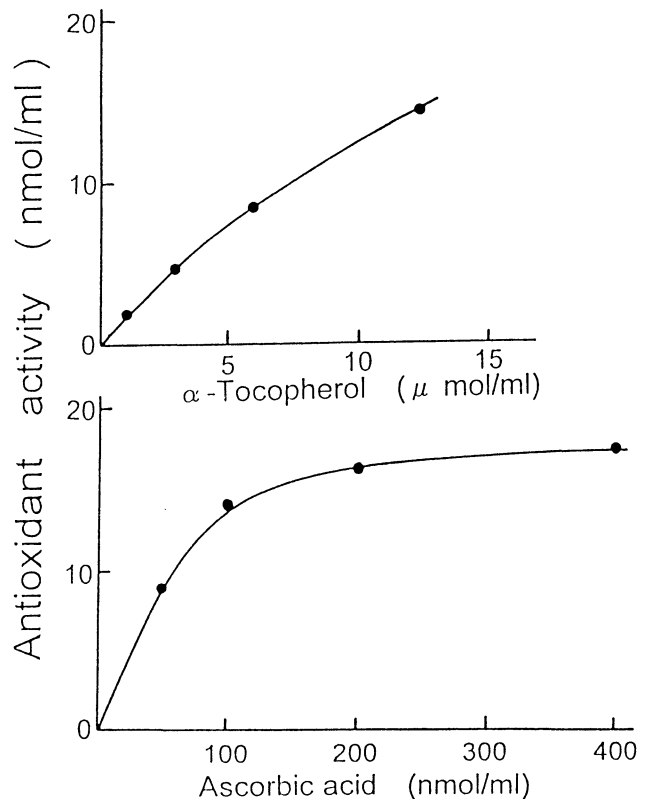


図3 ケルセチンの抗酸化能

能 total antioxidant activity の一部をなしていると考え
るべきであろう。

この結果は血清抗酸化能を高めるためには、ワイン
である必要はなく、抗酸化物質を溶解している飲食物
を摂取することが肝要であることを示唆する。抗酸化
能を有する飲料物の常用により血清抗酸化能が高めら
れるとするならば、活性酸素種が関連するとされる各
種疾病の予防・治療・管理のいずれの点においてもこ
れらの飲料の常用は有意義と考えられる^{5) 6)}。各種飲
料物と血清抗酸化能の変化の関連や疾病との関連にお
ける検討は今後の課題である。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、ワイン中の亜硫酸ナトリ
ウム定量と製造段階での亜硫酸ナトリウム添加に関す
るデータの提供を岩の原葡萄園株式会社より受けまし
た。ここに深く感謝いたします。

文 献

- 1) Maxwell, S., Cruickshank, A., Thorpe, G., : Red wine and antioxidant activity in serum, *Lancet*, 344, 193-194, 1994.
- 2) 杉田 収, 三井田孝, 松戸隆之, 他: クメンヒドロペル
オキシドを用いたヒト血清抗酸化能の測定, *臨床病理*,
43補冊, 207, 1995.
- 3) Ohishi, N., Ohkawa, H., Miike, A., et. al : A new assay
method for lipid peroxide using a methylene blue
derivative. *Biochem. Int.* 10, 205-211, 1985.
- 4) Miller, N. J., Rice-Evans, A.: Antioxidant activity of
resveratrol on red wine, *Clin. Chem.*, 41, 1798, 1995.
- 5) Whitehead, T.P., Robinson, D., Allway, S., et al. : Effect of
red wine on the antioxidant capacity of Serum, *Clin. Chem.*,
41, 32-35, 1995.
- 6) Struck, M., Watkins, T., Tomeo, A., et al. : Effect of red and
white wine on serum lipids, platelet aggregation, oxidation
products and antioxidants : a preliminary report, *Nutr.*
Res., 14, 1811-1819, 1994.