

大分県産スウィートバジルの抗酸化性に関する研究 (第3報)

— *in vitro*, *in vivo*における脂質代謝に及ぼす影響 —

山本展久*・水江智子*・佐野一成*・高野 済**・宮本安紀子**・望月 聡***

*食品工業部・**㈱ファインド・ニュース・***大分大学教育福祉科学部

Study on the Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Cultivated in Oita (3rd. report)

— Evaluation of Antioxidant Activity of Sweet Basil Extract *in Vitro* and *in Vivo* —

Nobuhisa YAMAMOTO*・Satoko MIZUE*・Kazunari SANO*

Naru TAKANO **・Akiko MIYAMOTO**・Satoshi MOCHIZUKI ***

*Food Science and Technology Division・**Find News Co.,Ltd

***Faculty of Education and Welfare Science, Oita University

要 旨

大分県産スウィートバジルの抗酸化性に着目し、ラット肝細胞を用いた *in vitro* 試験、ラットおよびマウスを用いた *in vivo* 試験の両面から生体内での抗酸化能を実証しようと試みた。ラット肝ホモジネートを AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane)-Dihydrochloride) で酸化誘発させる系においてスウィートバジル抽出液はホモジネートへの 0%~10%の添加量範囲で濃度依存的に脂質過酸化を抑制した。また、ラット肝ミクロソームを用いた系においてもスウィートバジル抽出液は過酸化脂質の生成を抑制した。スウィートバジル抽出液をラットに給餌したところ、肝臓脂質の過酸化は抑制されていたが、AAPH で酸化誘発させる系においては、逆にスウィートバジルを給餌した方が酸化が促進された。これは体内に取り込まれたスウィートバジル抗酸化性成分が体内代謝を受けてラジカル捕捉状態に遷移したためと推察した。このことを確認するため、スウィートバジル給餌ラットの肝臓ホモジネートについて酸化誘発しない系で抗酸化性を測定したところ、対照に比べて脂質過酸化が促進された。マウスにアドリアマイシンを投与し人為的に過酸化脂質量を上昇させる系では、スウィートバジルを給餌することで明らかにアドリアマイシンの副作用を抑制することが確認できたが、過酸化脂質量には変化なかった。

1. 緒 言

現在の日本における死因の第1位は悪性腫瘍、いわゆるガンである。しかしながら、2位の心臓病、3位の脳血管障害をあわせた動脈硬化に起因する疾患はガンを抜いて1位となる。厚生省により「成人病という表現ではなく生活習慣病が適切である」と発表されたことは記憶に新しい。上記三死因—ガン・心臓病・脳血管障害—の発症には、遺伝的な要因に加えてライフスタイル、特に食生活が大きく影響していると考えられている。伝統的な日本食には、塩分の過剰摂取等の問題はあるにせよ、機能的な食品群が多い。このことが世界一の長寿国を作り上げたと言っても過言ではない。しかし、食生活環境の変化にともない様々な問題が噴出していることは否定できない。このような考えの中、食生活の改善に加え、食品中に疾病予防・自然治癒能力の増強といった機能性を求める動きも大きくなっている。「食品による疾病の

予防」を目的とした機能性食品の研究プロジェクトは、日本が世界に先駆けてスタートし、現在「ファンクショナルフーズ研究」として、世界の「食と健康」研究の分野をリードしている⁽¹⁾。

こうした動きのなかで、90年代初めから「食品の抗酸化性」に多くの注目が集まることとなった。なかでも“フレンチ・パラドックス”と呼ばれる疫学的事実が知られるようになってから抗酸化食品と呼ばれるものが市場に出回るようになった。フレンチ・パラドックスとは、欧米各国において高頻度に見られる動脈硬化による死亡率と脂肪の大量摂取（特に動物性脂肪）との間の正の相関に対して、フランスにおいては脂肪の大量摂取の割に動脈硬化性疾患の死亡率が少ないという逆説を指す。この原因としては、以前からフランスで消費量の多い赤ワインの寄与が指摘されていた⁽²⁾。抗酸化性の発現には、赤ワインに代表されるポリフェノールの関与も考察され

ており、現在様々なポリフェノールの研究が世界中で行われている。

我々は平成9年度の研究において、大分県内で栽培されたスウィートバジルは *in vitro* において抗酸化性を有し⁽³⁾、野菜・果物類と比較したところ、最も強い活性を有するグループに属することを確認した (Table I)。また、我々は大分県産スウィートバジルの有する抗酸化性のうちおよそ 50% が主要香氣成分である Eugenol によるものであることを報告した⁽⁴⁾。さらに、大分県産スウィートバジルはポリフェノールを高濃度 (580mg/100g 生葉) に含有することを解明し、抗酸化性の要因の一つであることを推測した。この一連の研究は、β-カロチンの退色⁽⁵⁾や DPPH を用いたラジカル消去能活性⁽⁶⁾を指標として行ったものである。本研究では、実際の生体内での抗酸化性成分の動向を解明するために、細胞レベル・組織レベルでの検討が必要不可欠と考え、ラット等を用いた生体内評価を試みた。

Table I 各種野菜の抗酸化活性

High Activity (~25mgBHA)	Medium Activity (25~5mgBHA)	Low Activity (5mgBHA~)
スウィートバジル	とうがらし 大根 枝豆	かぼちゃ きゅうり
春菊 みつば ショウガ	ほうれん草 ゴボウ	キャベツ かぶ ねぎ
おくら ビーマン にら	もやし ニンニクの芽	らっきょう レタス
ミニトマト あしたば	カリフラワー 白菜 里芋	にんじん セロリ
アスパラガス パセリ	おかひじき さつまいも	あさつき
レンコン かいわれ菜	チンゲン菜 ジャガイモ	メロン すいか
さやいんげん	さやえんどう わけぎ	

2. 実験方法

2.1 サンプルの調製

スウィートバジルの生葉 5g をエタノールとともにホモゲナイザー (日本精密工業㈱製, ヒストコロ) で磨砕した。濾過した後、エタノールで洗浄し、洗液と合わせて 50ml とした。これは *in vitro* の試験に供した。

ラットおよびマウスの飼料用には以下の方法でサンプル調製を行った。すなわち、スウィートバジルの生葉を 2 倍容のエタノールとともにパーティカルカッターミキサー (㈱FMI 製, ロボ・クープ) でホモジナイズした。吸引濾過した後、残渣を 1 倍容のエタノールで洗浄し、洗液と合わせ、4 倍抽出とした。抽出液全量をエバポレーターを用いて 40℃ の加温下エタノールを減圧蒸発させた。蒸留残渣を少量のエタノールに懸濁し、スウィートバジル抽出物とした。このスウィートバジル抽出物はエタノールを含んでいるので、正確な抽出量を求めるために定法に従い、酸化還元滴定法⁽⁷⁾でアルコール含

量を測定し、アルコール分を差し引いて真の重量を算出した。この操作でスウィートバジル生葉 2.4kg から 108g の抽出液を得、アルコール分は 12.4% であった。

また、条件によってラットの飼料用には、スウィートバジル生葉を真空凍結乾燥に供し、細かく粉末状にしたものを用いた。

2.2 過酸化脂質の測定法

過酸化脂質の測定は内藤らの方法⁽⁸⁾に従って行った。すなわち、フタ付きネジ口試験管に試料を 150 μl 入れ、1.5ml 0.05N 塩酸、0.5ml 0.67% チオバルビツール酸を加えて 95℃ 湯浴中に 30 分保ったのち、氷冷し、2ml 15% メタノール含有 n-ブタノール溶液を加えて激しく振とうしたのち、3000rpm 20 分間遠心分離して、上層のブタノール層の 535nm での吸光度を測定した。

定量値を求めるには、1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) を標準物質として検量線を作成し、TEP 相当量として算出した。

2.3 *in vitro* での抗酸化性

2.3.1 ラット肝ホモジネートを用いた AAPH による酸化誘発における抗酸化試験⁽⁹⁾

ウイスター系雄ラットより得られた肝臓に 19 倍容の 20mM リン酸緩衝液 (pH7.4) を加え氷冷しながらホモジナイズした。得られたホモジネート 6ml を三角フラスコに分注し、酸化促進剤である 2,2'-Azobis(2-amidino-propane)-Dihydrochloride(AAPH)の 500mM 溶液を 60 μl 加え (最終濃度 5.0mM)、さらにスウィートバジル抽出液を添加した。37℃ の湯浴中で緩やかに振とうして反応させ、経時的 (0,2,4,6,8 時間後) に 1ml をサンプリングし、直ちに 20% BHA エタノール溶液 10 μl を添加して反応を停止させ、2.2 に従って脂質の過酸化度を測定した。

2.3.2 ラット肝ミクロソームを用いた抗酸化試験⁽⁹⁾

ウイスター系雄ラットの肝臓より得られたミクロソーム懸濁液⁽¹⁰⁾を使用に際して 1.5mg/ml のタンパク質濃度になるように 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) : 0.15M 塩化カリウム溶液 = 1 : 2 で希釈して用いた。ミクロソーム懸濁液 250 μl にスウィートバジル抽出液をエタノールで適宜 (×5, ×10, ×20, ×50) 希釈した被験液 25 μl, 2mM ADP, 0.1mM-0.2mM EDTA-FeCl₃, 0.5mM NADPH をそれぞれ 250 μl 添加し、37℃ の湯浴中で緩やかに振とうしながら 30 分間インキュベートし反応後直ちに氷冷して反応を停止させ、2.2 に従って脂質の過酸化度を測定した。

2.4 *in vivo* での抗酸化性

2.4.1 ラットを用いた生体内での抗酸化試験

ウイスター系雄ラットに普通食および普通食にスウィ

ートバジル抽出物 (0.5, 1.0, 2.0%), または真空凍結乾燥葉粉末 (2.0%) を添加したものを摂取させ, 1 群 6 匹で飼育した. 飼育期間は 14 日間とし, 飼料および水は自由摂取させた. 飼育 14 日目に肝臓を摘出し, 2.2 に従って肝臓中の脂質の過酸化度を測定した. また, 肝臓ホモジネートについて 2.3.1 の抗酸化試験に供した.

2.4.2 マウスを用いた生体内での抗酸化試験

アドリアマイシンは抗ガン剤として用いられる薬剤であるが, 副作用として心臓の過酸化脂質量を増加させることが知られている. そこでマウスを用いて人為的に過酸化脂質を上昇させる系を試みた. 普通食群 8 匹, 普通食を与えて屠殺 4 日前に 15mg/kg のアドリアマイシンを腹腔内投与した群 10 匹 (ADR 群), スウィートバジル抽出液 2.0% 添加食を与えアドリアマイシンを投与した群 10 匹 (Basil 群) の計 28 匹の心臓を摘出し, 100 倍容の生理食塩水でホモジナイズした後, 2.2 に従って過酸化脂質量を測定した.

2.5 DPPH を用いたラジカル消去能の測定法⁽⁶⁾

安定なラジカル剤 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を用いたラジカル消去能を指標に抗酸化活性を測定した. DPPH は 517nm に吸収をもつ化合物 (紫色) であり, ラジカルが消去されることにより, 517nm における吸収が消滅する. 高速液体クロマトグラフ (HPLC) での DPPH のピーク面積の減少量から非ラジカル体への変換量, つまりラジカル消去能を測定した.

すなわち, 100mM Tris-HCl Buffer (pH7.4) 80 μ l, 500 μ M DPPH エタノール溶液 100 μ l, 被験液 20 μ l をサンプルチューブ中で激しく攪拌し, 20 分間暗所で放置した. 放置後, 以下に示す HPLC 装置を用いて DPPH を分離定量した.

Column : TSKgel Octyl-80Ts (4.6 ϕ \times 150mm)
 Eluent : MeOH/H₂O (70/30)
 Flow rate : 0.8 ml/min
 Temp. : 35°C
 Detect : 517nm
 Sample : 20 μ l

標準の抗酸化性物質として 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) を用い同様な操作を行い, 抗酸化活性を Trolox 相当量として求めた.

3. 結果及び考察

3.1 ラット肝ホモジネートを用いた抗酸化試験

この系ではラジカル発生剤である AAPH を用いてラット肝ホモジネート中の脂質の過酸化を人為的に引き起こさせ, その過酸化に対してスウィートバジル抽出液の

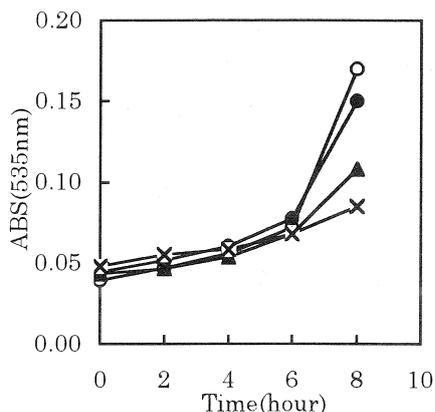


Fig.1 Antioxidant Activity of Sweet Basil Extract in the Rat Liver Homogenate-AAPH System

○— Control ●— 2%
 ▲— 5% ×— 10%

抑制効果を検討したものである. 結果を Fig.1 に示した. 横軸には時間を, 縦軸には過酸化脂質量を 535nm での吸光度で表した. スウィートバジル抽出液を加えないコントロールにおいては経時的に脂質の過酸化度は上昇しているが, スウィートバジル抽出液を添加することで添加濃度に依存して効果的に脂質の過酸化が抑制されていた. このことからスウィートバジルは生体に対して *in vitro* の系では抗酸化性を効果的に発揮すると考えた.

3.2 ラット肝ミクロソームを用いた抗酸化試験

この系ではラット肝ミクロソーム画分に含まれる酵素系により NADPH を電子供与体として鉄を還元し, 生じた 2 価鉄が脂質の過酸化を引き起こす⁽¹¹⁾ ことを応用している. 結果を Table II に示した. コントロールを 100 とした時の各希釈率での脂質過酸化度を相対値で表した.

Table II Antioxidant Activity of Sweet Basil Extract in the Rat Liver Microsome System

Lipid peroxidation	
Control	100
×50	100
×20	98
×10	94
×5	86
×1	35
BHA	0.6
α -Tocopherol	0.6

標準抗酸化物質として BHA および α -Tocopherol の 20mg/ml エタノール溶液を用いた。スウィートバジル抽出液は添加濃度に依存して脂質の過酸化を抑制し、この系においても *in vitro* の系では抗酸化性を示した。

ミクロソームは小胞体の細分化によって生じた小胞が主成分であり、この系はその小胞中に存在する薬物代謝系酵素によって引き起こされる酵素的な脂質過酸化を測定する系である。実際の生体内での脂質過酸化に即した系として生体内抗酸化性を評価できると考えられている⁽¹¹⁾。その反応機構として、ミクロソームに存在するシトクロム P-450 リダクターゼ等により活性化されたペリフィリルイオンが直接不飽和脂肪酸から水素を引き抜く反応（ペリフィリルイオン依存開始反応）と、それに続くシトクロム P-450 リダクターゼにより生じた EDTA-Fe²⁺が脂肪酸ヒドロペルオキシドの分解を促進して生成した種々のラジカルや一重項酸素が脂質過酸化を引き起こす反応（脂肪酸ヒドロペルオキシド依存開始反応）とが考えられている。ポリフェノールの中にも前者を抑制するものと後者を抑制するものがあり、抗酸化機構は抗酸化物質によって異なっていると考えられている。本研究で対象としているスウィートバジルには数種のポリフェノールが大量に含まれていることが明らかとなっている⁽⁴⁾。今後はポリフェノールの分離同定と共に個々の作用機作を解明することが重要である。

3.3 ラットを用いた生体内での抗酸化試験

3.3.1 スウィートバジル抽出液を給餌した試験

以上までの *in vitro* 試験の結果をもとに、ラットにスウィートバジルを給餌したときの生体内抗酸化性を観察した。普通食群、スウィートバジル抽出液 0.5% 添加食群、1.0% 添加食群、2.0% 添加食群各 6 匹ずつの肝臓ホモジネートについて過酸化脂質量を測定し、TEP 相当量として 6 匹の平均値を算出した。結果を Table III に示した。普

Table III Levels of Lipid Peroxidation of Liver of Rat Administered Sweet Basil

	TEP (nmol/g Liver)
Basal	9.2
0.5% Basil	7.4
1.0% Basil	7.2
2.0% Basil	7.7

通食群と比較してスウィートバジル添加食群ではいずれも過酸化脂質量が減少していたが、普通食群での過酸化脂質の量があまり上昇せず、明確な結果とはならなかった。しかし、若干ではあるが、スウィートバジル給餌に

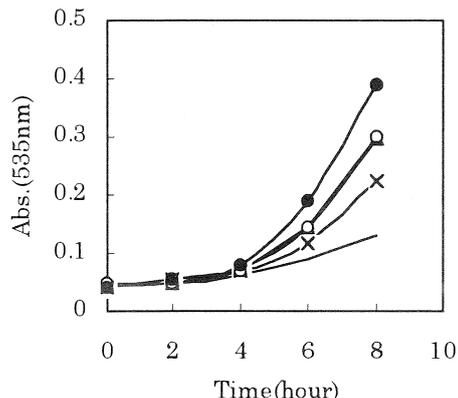


Fig.2 Antioxidant Activity of Sweet Basil in the Rat Liver Homogenate-AAPH System

— 5%Basil —x— Basal —▲— 0.5%
—○— 1.0% —●— 2.0%

より肝臓中の脂質過酸化が抑制されたと言える。今後は飼育中に脂質過酸化を促進する系を用いて検討する必要があると考えられる。

次に肝臓中の抗酸化機構を解明するために 2.3.1 に従ってスウィートバジルを給餌したラットの肝臓ホモジネートについて AAPH による酸化誘発での抗酸化能を測定した。結果を Fig.2 に示した。同時に比較のため、スウィートバジル抽出液を 5.0% となるように普通食群の肝臓ホモジネートに添加した *in vitro* 試験 (5%Basil) も行った。5.0% 添加 (5%Basil) では普通食群に比較して優位に脂質過酸化が抑制されていた。しかしながら、スウィートバジル給餌群では AAPH による酸化誘発で脂質過酸化を抑制することができず、給餌濃度に反比例して抗酸化能は減衰していた。これは、体内に取り込まれたスウィートバジル抗酸化性成分が体内代謝（酸化）を受けて酸化状態（ラジカル捕捉状態）に遷移したためと推察した。この現象を確認するために肝臓ホモジネートのラジカル消去能を 2.5 に従って測定した。その結果

Table IV Radical Scavenging Activity of Liver of Rat Administered Sweet Basil

	Trolox equ. (μ mol / g Liver)
Basal	29.6
0.5% Basil	29.0
1.0% Basil	23.4
2.0% Basil	25.0

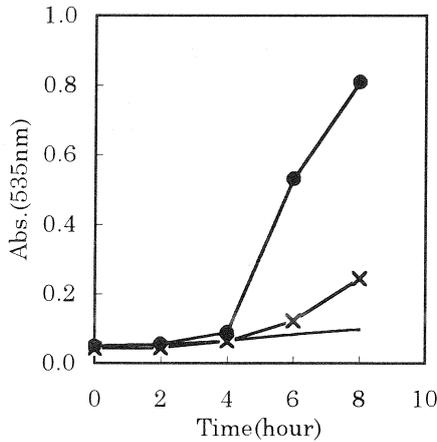


Fig.3 Antioxidant Activity of Liver of Rat Administered Freeze-dried Sweet Basil Leaf in the Homogenate-AAPH System

—x— Basal — 5%Basil ● FD-Diet

を TableIV に示した。推測通り、普通食群で最も活性が強く、スウィートバジル給餌によって肝臓ホモジネート中のラジカル消去能は弱くなっていた。特に 1.0%以上の添加で活性は弱くなっていた。このことからスウィートバジルの抗酸化性成分は肝臓中にラジカルを捕捉した状態で存在すると考察した。

3.3.2 凍結乾燥スウィートバジルを給餌した試験

本研究でのスウィートバジル給餌量は、例えば抽出液 2.0%添加食群では飼料 100g あたり生葉約 50g (乾燥葉約 5g) 相当量を添加したことになる。また、飼料用サンプル調製時に 40℃で減圧濃縮するために抗酸化性成分の劣化が予想された。そこでこの点を予防することと今後の操作性を考慮に入れて、真空凍結乾燥標品を用いることとした。その添加量は飼料 100g あたり乾燥物 2g (2.0%) とした (FD 添加食群)。

普通食群, FD 添加食群のラット肝臓について 2.3.1 に従って肝臓ホモジネートの AAPH による酸化誘発での抗酸化能を測定した。結果を Fig.3 に示した。同時に比較のため、スウィートバジル抽出液を 5.0%となるように普通食群の肝臓ホモジネートに添加した *in vitro* 試験 (5%Basil) も行った。この系でも FD 添加食群で明らかに脂質の過酸化を促進することが観察され、この効果はスウィートバジル抽出液 2.0%添加食群よりも顕著であった。これは抽出物の場合抗酸化性成分が 100%抽出できないこと、また濃縮中に変性してしまうことが要因であると考えられた。この系では AAPH によって酸化誘発をしているため、ラジカルを捕捉した抗酸化性成分は酸化剤として AAPH を補助するものと考察した。このこ

Table V Levels of Lipid Peroxidation of Liver of Rat Administered Sweet Basil after Oxidation with or without AAPH

	AAPH conc. (mM)	Time(hour)		
		0	8	24
Basal	0.0	4.1	5.3	7.9
	0.1	3.9	5.5	9.6
	1.0	5.6	7.4	10.3
	5.0	6.3	36.2	88.2
Basil	0.0	5.6	9.9	14.2
	0.1	5.8	10.1	12.0
	1.0	7.2	11.3	32.5
	5.0	7.0	62.4	155.0

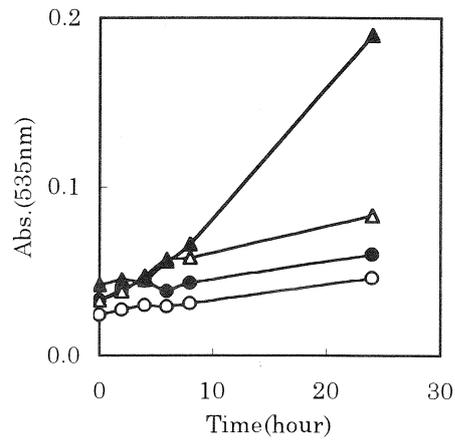


Fig.4 Antioxidant Activity of Liver of Rat Administered Freeze-dried Sweet Basil Leaf with or without AAPH

○ Basal
● Basal with 1mM AAPH
△ Basil
▲ Basil with 1mM AAPH

とを実証するため同じ肝臓ホモジネートを用いて AAPH なしの系で 2.3.1 の実験を行った。

3.3.3 酸化誘発しない系での *in vitro* 試験

2.3.1 で AAPH の終濃度を 0, 0.1, 1.0, 5.0mM になるように添加して同様に実験を行った。明らかな差を出すために時間を 24 時間まで延長して測定した。各 AAPH 濃度における生成過酸化脂質量を TEP 相当量として算出し、TableV に示した。また、AAPH 0mM と 1.0mM の経時変化を Fig.4 に示した。AAPH のいずれの濃度でも普通食群に比べて FD 添加食群の方が脂質過酸化が促進されていた。特に AAPH 1.0mM 添加区では 24 時間

で普通食群よりFD添加食群の方が3倍ほど過酸化が促進されていた。また、FD添加食群では酸化誘発していない状態(0mM AAPH)でも普通食群を1.0mM AAPHで酸化誘発したものより脂質が過酸化を受けていた。以上のことより、スウィートバジルの抗酸化性成分は体内で代謝されるに従い、酸化されラジカル化した状態で肝臓内に蓄積することが示唆された。その強度は1.0mM AAPHに匹敵するものであった。

3.2 マウスを用いた生体内での抗酸化試験

ラットを用いた系では *in vivo* における抗酸化活性を明確にすることはできなかった。そこでマウスに人為的に酸化ストレスを与えることでスウィートバジル抗酸化性の実証を試みた。2.4.2に従い普通食群、ADR群、Basil群を解剖し、心臓の過酸化脂質量を測定した。結果をTable VIに示した。結果はいずれの群においてもあまり差は見られなかったが、肉眼的に観察すると解剖前のマウスの状態には明らかな差が見られた。ADR群は体毛が逆立って、ほとんど動けない状態であったが、Basil群は普通食群と変わらず立毛も見られず普通の状態であった。スウィートバジルを給餌することで明らかにアドリアマイシンの副作用を抑制することが確認できたが、今回の方法で測定した過酸化脂質量には変化がなかったことから過酸化脂質以外のマーカーを検索する必要があると思われた。

Table VI Levels of Lipid Peroxidation of Heart of Mouse Administered Sweet Basil after Administering Adriamycin

	TEP(nmol/gHeart)
Basal	27.4
ADR	26.5
Basil	28.2

4. まとめ

大分県産スウィートバジルの抗酸化性に着目し、ラット肝細胞を用いた *in vitro* 試験、ラットおよびマウスを用いた *in vivo* 試験の両面から生体内での抗酸化能を実証しようと試みた。結果として、以下の知見が得られた。

1. ラット肝ホモジネートをAAPHで酸化誘発させる系においてスウィートバジル抽出液は0%~10%の範囲で濃度依存的に脂質過酸化を抑制した。
2. ラット肝ミクロソームを用いた系においてもスウィートバジル抽出液は過酸化脂質の生成を抑制した。
3. スウィートバジルをラットに給餌したところ、肝臓脂質の過酸化は抑制されていたが、AAPHで酸化誘発させる系においては、逆にスウィートバジルを給餌し

た方が酸化が促進された。これは体内に取り込まれたスウィートバジル抗酸化性成分が体内代謝を受けてラジカル捕捉状態に遷移したためと推察した。

4. スウィートバジル給餌ラットの肝臓ホモジネートについて酸化誘発しない系で抗酸化性を測定したところ普通食群に比べて脂質過酸化が促進された。この現象はAAPHを添加することで顕著であった。
5. マウスに人為的に酸化ストレスを与えた系において、スウィートバジル添加食群ではアドリアマイシンによる副作用が抑制され、何らかの作用があるものと考えられた。しかし、数値的には捕らえることができず、他のマーカーを検索する必要があると思われた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ラット肝ミクロソーム懸濁液をご提供下さいました山口県立大学生物科学部栄養学科人見英里博士に感謝いたします。

参考文献

- 1) 大澤俊彦：「発がん予防研究『デザイナーフーズ』計画の現状と動向」, 1, (1996), p32-, 栄養と健康のライフサイエンス
- 2) 近藤和雄, 岩本珠美：日本食品工業学会誌, 41(14), (1998), p42-48
- 3) 山本展久, 水江智子, 望月 聡：平成9年度大分県産業科学技術センター研究報告, (1998), p122-125
- 4) 山本展久, 水江智子, 佐野一成, 高野 済, 望月 聡：平成10年度大分県産業科学技術センター研究報告, (1999), p181-184
- 5) 津志田藤二郎, 鈴木雅博：日本食品工業学会誌, 41(9), (1994), p611
- 6) T.YAMAGUCHI, H.TAKAMURA, T.MATOBA, J.TERAOKA： *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(6), (1998), p1201-1204
- 7) 前田安彦：「初学者のための食品分析法」, (1990), p94-97, 弘学出版
- 8) 内藤周幸, 山中 健：日本老年医学会雑誌, 15(3), (1978), 187-191
- 9) 人見英里, 田村聡美, 鶴本祐子, 津田孝範, 中野昌俊：日本食品科学工学会誌, 46(12), (1999), p779-785
- 10) 川岸舜朗：「生物化学実験法 38 食品中の生体機能調節物質研究法」, (1996), p18-
- 11) 中村 良, 川岸舜朗, 渡邊乾二, 大澤俊彦：食品機能化学, (1991), p89-, 三共出版