

AAPH 由来ペルオキシラジカルとルミノール化学発光を 組み合わせたラジカル捕捉活性測定条件の検討

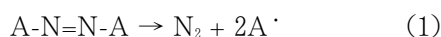
北 尾 悟
壺 井 輝 子
千 賀 靖 子
高 橋 夏 子

1. 緒言

活性酸素は水や酸素から生成され、酸素そのものよりも活性な酸素分子種である。例えば、水分子に紫外線が照射されると $H\cdot$ と $OH\cdot$ に切断される。これらは水素原子 (ラジカル) とヒドロキシルラジカルと呼ばれ、特にヒドロキシルラジカルは生体にとって毒性の高い活性酸素でありラジカルでもある。ラジカルとは対を形成することができない電子、つまり不対電子が分子軌道あるいは原子軌道を占有した遊離基のことである。酸素を利用し生体内エネルギーであるアデノシン 3 リン酸を効率良く得ようとする好気生物の生体内には様々な活性酸素やラジカルが生成している。特にミトコンドリア内の電子伝達系において、これら活性酸素やラジカルが多く生成する。ヒトは 1 日に 2,500 リットル以上もの空気を吸って、そのうちの数%の酸素が活性酸素に変化するといわれている。生体にとって活性酸素やラジカルは、免疫システムの中で細菌などの異物の除去に働いたりするなど、なくてはならない存在ではあるが、ある一定レベル以上に達すると逆に悪影響をもたらす。例えば、細胞膜や血管内皮細胞の酸化により、ガンや動脈硬化を引き起こすことなどが挙げられる。この他にも老化の引き金となるとも言われている。ヒトを始めとする好気生物は元来、これら活性酸素やラジカルを捕捉消去するしくみを持ち合わせている。スーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼなどのラジカル消去酵素やビタミン E などの抗酸化ビタミンなどがその例である。しかしながら、大過剰に活性酸素やラジカルが生成したとき、これら生体内の防御機構だけでは捕捉消去することが困難となる。そこで、食物成分から活性酸素やラジカルを捕捉消去する成分を摂取することが注目されるようになってきた。前述のビタミン E やビタミン C、カテキンやフラボノイドなどのポリフェノール化合物などが、抗酸化能・ラジカル捕捉活性を有することは広く知られている。^{1)~3)}

今日、食品成分の抗酸化能・ラジカル捕捉活性を評価する方法は、様々提案されている。これらはそれぞれ測定原理が異なり、評価方法によっては必ずしも結果が一致しない場合がある。古くは、食品の品質保蔵に対しての抗酸化能の評価として、食品試料の酸化に伴う重量増加の抑制度から評価する重量法や、油脂の酸化を指標とした過酸化物質価から評価するオープン法などがあった。近年はラジカルを捕捉消去する作用を直接評価する方法が主流となってきている。ラジ

カル捕捉活性測定系には、ラジカル発生剤が必要である。様々なラジカル発生剤が知られているが、アゾ化合物は加温によりペルオキシラジカルを定量的に生成することから、現在、使用例が増えてきている。アゾ化合物とは、一般式 R-N=N-R' (R, R' はアルキル基またはアリール基) で表される化合物の総称であり、N=N の二重結合はトランス形である。アミンとニトロソ化合物との縮合反応により比較的容易に合成される。アゾ化合物のなかで、2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride (AAPH) は水溶性であり、生成したペルオキシラジカルが脂質ミセル、リン脂質リソソームや赤血球膜の脂質自動酸化に伴うラジカル連鎖反応を引き起こすことが確認されている。また、発生したペルオキシラジカルが、脂質、タンパク質、そして DNA 分子の構造変化をもたらすことも知られている⁴⁾。さらに、動物実験であるが、直接 AAPH を摂取することにより、リンパ球・腎臓・肝臓のような生体器官に損傷を与え、動脈硬化・虚血・再灌流障害・炎症などをもたらすことも確認されている。AAPH は次式 (1-3) に示したように、酵素反応や生体内代謝などによらず、加温処理により容易に 1 分子の窒素分子と 2 分子の炭素を含むラジカルを発生する。このラジカルは好氣的条件下、酸素分子と反応しペルオキシラジカルとなる。



AAPH のラジカル生成 (分解) は温度以外にも pH などに影響を受ける。37°C 中性 pH 領域では、AAPH の半減期は約 175 時間であり、最初の数時間は時間依存的に一定速度で分解される。この条件でのラジカル発生速度定数は、 1.36×10^{-6} mol/liter/sec である⁵⁾。

時間依存的に発生する AAPH 由来ペルオキシラジカルを検出測定する手段としてルミノール化学発光が挙げられる。ルミノール化学発光は、過酸化水素と血液の存在下、ルミノールが強い化学発光を示すことに依る。活性酸素種とルミノールがアルカリ pH 条件下、アミノフタル酸に酸化されるときに化学発光をもたらす。脂質ペルオキシドをペルオキシダーゼの酵素反応により生じたラジカルをルミノール化学発光法により測定する方法が報告された⁶⁾⁻⁸⁾。その後、AAPH ペルオキシラジカルをルミノール化学発光により測定する系 (AAPH-CL) も示された⁹⁾。最近ではこの方法の有用性も報告されている¹⁰⁾。AAPH-CL 法では反応系にカテキンなどのラジカル捕捉物質が共存すると結果的に発光量が抑制されるため、発光減少量によりラジカル捕捉活性を算出することが可能となる。この AAPH-CL 法によるラジカル捕捉活性の精度をあげるためには、ラジカル捕捉物質が共存していないときの値 (コントロール) が大きいことが望ましい。

茶は中国に起源をもつ世界で最も長い歴史を有する飲料である。その中でポリフェノールオキシダーゼの酵素作用を受けずに製造される緑茶は、「日常茶飯事」という言葉が示すように、昔から米とともに我々の生活に深く根をおろし、嗜好に合う飲料として親しまれて来た。緑茶はその茶樹の栽培方法により、覆下園で育った樹葉からの抹茶 (碾茶) や玉露、露天園で育った煎茶

とほうじ茶などがある。一般的に覆下園由来の茶はテアニンなどのアミノ酸が豊富で旨味や甘味が強く、露天園由来の茶はカテキンなど渋味が強い味となる。茶のいれ方も、前者では比較的低い温度（50～60℃）で長い浸出時間（2～3分）、後者は高い温度（70～100℃）で短い時間（0.5～2分）が美味しく飲用できると言われている¹¹⁾。雁ヶ音茶は、所謂、茎茶とも呼ばれ、玉露や煎茶などを作る過程で取り出された葉軸や浮葉を中心として製造された高級茶である。元は、葉茶の副産物として軽視する向きもあったが、葉茶にはない「コク」を求めて、愛喫者が増えてきている¹²⁾。なぜ、「雁ヶ音」と呼ぶのかは、実はよく分かっていない。雁が海上で羽を休めるため小枝を海の止まり木として使用し、日本に渡って来る際、その小枝が浜辺に打ち上げられる。その小枝を今度は北方に帰る時にくわえて、また止まり木として使うのだが、運悪く日本で命を落としてしまった雁の小枝、つまり主のいない小枝が浜辺に残る。その小枝を集めて焚いた風呂を雁風呂というが、故郷に帰れなかった雁の哀しい鳴き声が風呂を焚いた際に聞こえてくるとのこと。その泣き声を雁ヶ音と呼ぶ。この小枝の山が、茎茶にそっくりなことから、雁ヶ音茶と呼ばれるようになったという説がある。この雁ヶ音茶のいれ方は、玉露由来か煎茶由来かでも大きく左右されるが、一般的には、熱めの湯に比較的湯量を多くするのが好ましいとされているが、玉露や煎茶ほど詳細には調べられていない。

本研究では、まず AAPH-CL 法の測定精度の向上のため、ラジカル捕捉物質非存在下での化学発光量（コントロール）の増大を指標として、加温時間などの条件を検討した。そして求められた条件で、茶の浸出条件と官能検査を実施し、「身体によく美味しい茶のいれ方」の一助となる基礎的データの取得を目指した。ここではその報告例がない雁ヶ音茶を選び検討を行った。

II. 実験方法

1. 材料

メチルアルコール、AAPH、四ホウ酸ナトリウム十水和物は和光純薬より購入した。ルミノールおよびチトクローム *c* はナカライテスク製特級試薬を使用した。また、その他の試薬は特級グレードを用いた。

雁ヶ音茶は、東大阪市内のスーパーより、株式会社宇治森徳（大阪府松原市）の「宇治雁ヶ音茶」を購入した。宇治茶を主体にしているが、伊勢茶や静岡茶もブレンドして、煎茶製造時に選別された葉軸や浮葉を使用している。

2. AAPH ラジカル捕捉活性の測定

基本的な測定条件は、前報⁹⁾に従った。測定原理を以下に簡単に説明する。AAPH は加温により窒素分子とアルキルラジカルを発生する。この発生したラジカルを好気条件下で酸化させるとペルオキシラジカルが生成される。このペルオキシラジカルをアルカリ条件下ルミノールを用いて発光させる方法を用いた（図1）。AAPH からのラジカル発生量は、温度と時間に依存すると言われている。また、構造が類似していることより、実際に脂質過酸化の発生剤として広く評価されている⁴⁾。もし AAPH 加温時に生成するペルオキシラジカルを捕捉する物質が存在

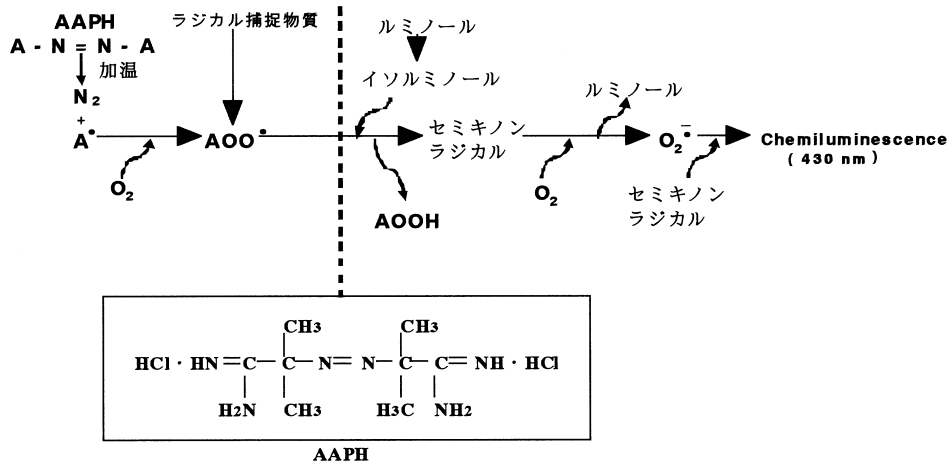


図1 AAPH ペルオキシラジカル生成とルミノール化学発光反応

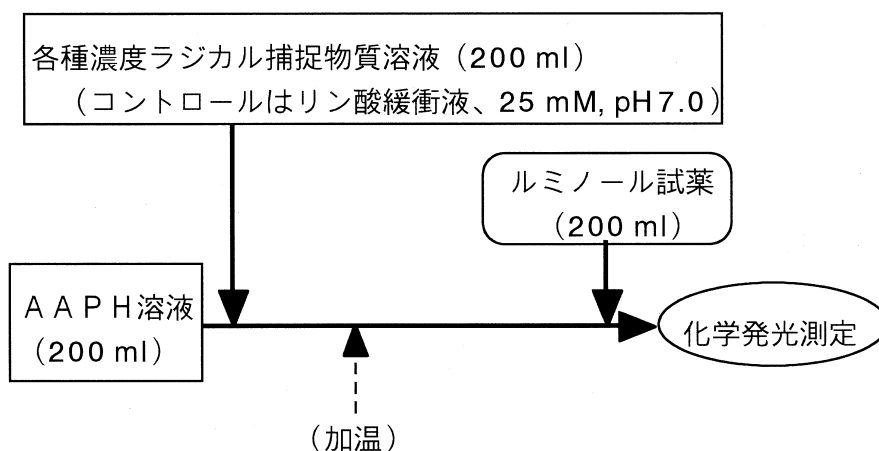


図2 AAPH-CL 法によるラジカル捕捉活性測定の手順

すると、生じたラジカルを捕捉消去するため一連の反応が停止し発光が起こらない。つまりラジカル捕捉能が強いほど発光量が抑制されることを意味する。

基本的な測定手順は次の通りである (図2)。40 mM となるよう 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に AAPH を溶解し、AAPH 溶液を作製した。この溶液と適当な濃度に溶解したサンプル溶液を 0.2 ml ずつ混合し、37°C で加温した。コントロールは、サンプル溶液の代わりにリン酸緩衝液を用いた。2 分間加熱後、直ちにルミノール試薬溶液 0.2 ml を混合し、化学発光量を測定した。ルミノール試薬溶液は、ルミノールとチトクローム *c* を 60 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.28)、水、そしてメタノールの混合溶液 (体積比 9:1:30) に溶解したものである。最終的な AAPH、ルミノール、チトクローム *c* の濃度は各々 13.333、0.038、そして 0.001 mM となる。化学発光量は、キッコーマン社製フォトンカウンターであるルミテスター C-100 を用いて測定した。発光量の単位は Relative Light Unit (RLU) である。1 RLU は 1 秒間に 43 フォトンが発生する量に相当する。ラジカル捕捉率は、次式 (4) で求めた。

$$(\text{RLU}_{\text{コントロール}} - \text{RLU}_{\text{サンプル}} / \text{RLU}_{\text{コントロール}}) \times 100 (\%) \quad (4)$$

RLUコントロールとRLUサンプルは、各々、リン酸緩衝液を用いたコントロール時のRLUとサンプル溶液を用いた時のRLUを示す。

3. ラジカル捕捉活性測定条件の検討

(1) 加温温度

基本温度は上記のように37°Cであるが、温度を20, 30, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70°Cと変化させて発光量を測定した。

(2) 加温時間

基本時間は2分間であるが、0, 2, 4, 6, 8, 10分と変化させて発光量を測定した。

(3) 初発 AAPH 濃度

25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解する時の AAPH 濃度を 20, 40, 60, 80, 100 mM と変化させて発光量を測定した (発光時の最終濃度はこれらの数字の 1/3 となる)。

(4) ルミノール試薬中のホウ酸緩衝液濃度

メタノール、チトクローム *c*、ルミノール溶液に溶解する四ホウ酸ナトリウム濃度を 60, 70, 80, 90, 100 mM と変化させて発光量を測定した (発光時の最終濃度はこれらの数字の 3/40 となる)。

3. 茶の浸出条件

雁ヶ音茶葉 1 g に各温度 (20, 60, 70, 80, 90, 100°C) の水 (湯) を 100 ml 加えて、各時間 (30, 60, 90, 120 秒) 浸出した後、濾紙 (アドバンテック東洋、No. 5A) を用いて濾過した浸出液を、AAPH-CL 法にてラジカル捕捉率の測定を行った。

4. 茶の官能検査

浸出条件と同じように浸出液を調製した。これらの中で、温度 (80, 90, 100°C) と時間 (60, 90, 120 秒) を組み合わせた茶を女子短大 2 年生 22~24 名 (平均年齢 20 歳) に飲用させ、嗜好の順に順位法にて評価させた。解析は、まず Kramer の検定法により順位の有意差を検定し、各群間は、Newell & MacFarlane 検定により有意差を求めた。

III. 結果と考察

1. AAPH-CL 法の化学発光反応条件の検討

AAPH-CL 法によるラジカル捕捉活性の精度をあげるためには、ラジカル捕捉物質が共存していないときの値 (コントロール) が大きいほど良い。ラジカル捕捉物質が溶解しているサンプル溶液の代わりに 25 mM phosphate 緩衝液 (pH 7.0) を用いたときの RLU が大きい条件を求めることとした。

(1) 加温温度

加温時間 2 分、初発 AAPH 濃度 20 mM、ルミノール中のホウ酸緩衝液濃度 60 mM に規定し

て、化学発光量を測定した（図3）。用いた温度の中で、70℃で一番発光量が高かったため、この時を100%とした相対値として表した。温度上昇とともに発光量も増大していく、つまり温度依存性があることが確認された。発光量が多い方が測定精度は高まるが、ラジカル捕捉物質の中には耐熱性が低い化合物が存在することや高温になれば溶液の蒸発により再現性が低くなるなどの理由より、45℃を採用した。なお、生体内での食品成分の評価に関しては、体温の37℃が望ましいことは言うまでもない。

(2) 加温時間

加温温度37℃、初発 AAPH 濃度 20 mM、ルミノール試薬中のホウ酸緩衝液濃度 60 mM に規定して、化学発光量を測定した（図4）。用いた時間の中で、8分で一番発光量が高かったため、これを100%とした相対値として表した。加温時間とともに発光量も増大していく、つまり時間依存性があることも確認された。ただ10分間の加温は8分とほぼ同じか少し減少傾向にあった。おそらく反応に用いた AAPH が8分間でほぼ分解されたと考えられる。初発 AAPH 濃度を上げ

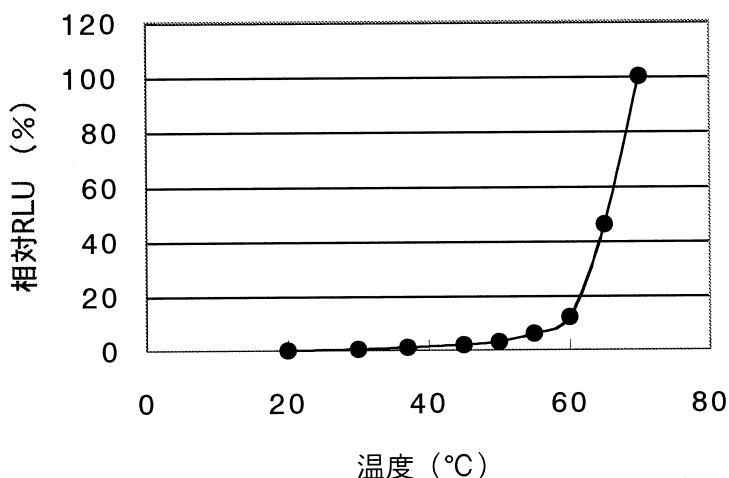


図3 加温温度による発光量の違い

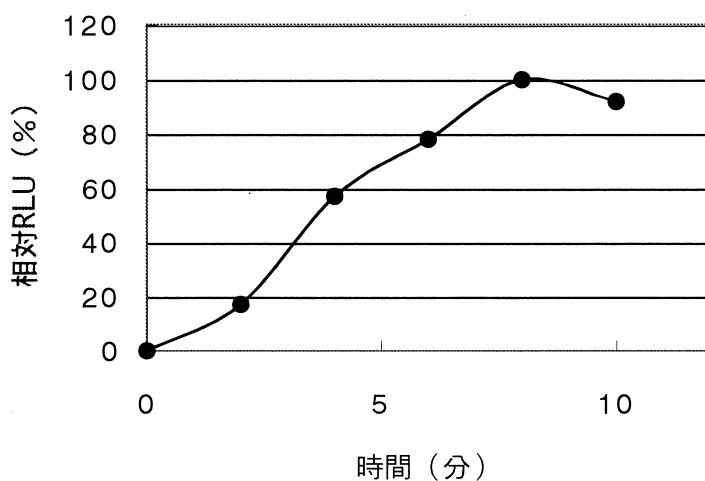


図4 加温時間による発光量の違い

ればさらに発光量が増えることが予想された。加温時間が長いほど測定精度が増すが、上述のように溶液の蒸発により再現性が低くなるなどの問題点があるため、測定時間を4分とした。

(3) 初発 AAPH 濃度

加温温度 37℃、加温時間 2 分、ルミノール試薬中のホウ酸緩衝液濃度を 60 mM に規定して、化学発光量を測定した (図 5)。用いた濃度の中で、80 mM で一番発光量が高かったため、これを 100% とした相対値として表した。AAPH 濃度とともに発光量も増大していく、つまり濃度依存性があることも確認された。ただ 100 mM は 80 mM とほぼ同じか少し減少傾向にあった。これは加温温度や加温時間が限定条件となったことが予想され、これらの条件を変えればさらに発光量が大きくなると考えられる。ここでは 80 mM を初発 AAPH 濃度とすることにした。

(4) ルミノール試薬中のホウ酸緩衝液濃度

加温温度 37℃、加温時間 2 分、初発 AAPH 濃度を 20 mM に規定して、化学発光量を測定した (図 6)。用いたホウ酸緩衝液濃度の中で、100 mM で一番発光量が高かったため、これを 100%

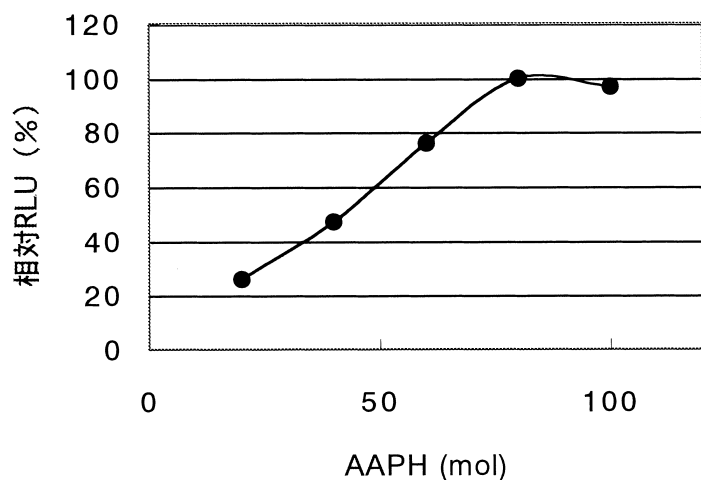


図 5 初発 AAPH 濃度による発光量の違い

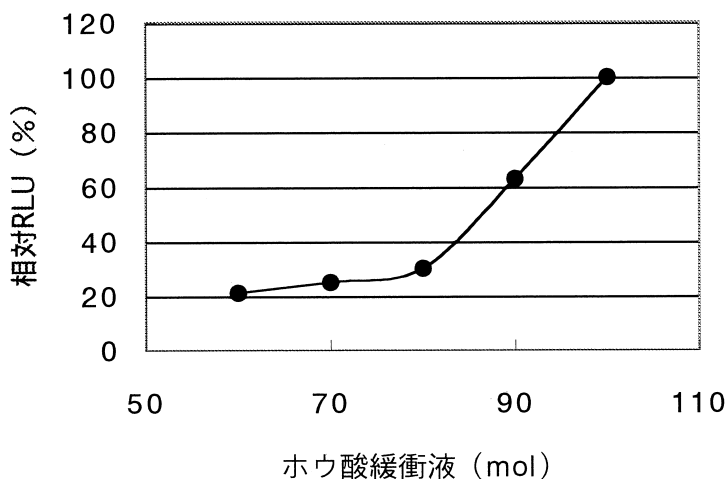


図 6 ホウ酸緩衝液濃度による発光量の違い

とした相対値として表した。80 mM まではなだらかに発光量が増えていったが、90、100 mM になると急激に発光量が増大した。高濃度のホウ酸緩衝液では、緩衝能が増し pH が安定したことにより、発光量が増大したことが予想された。さらに高濃度の緩衝液による発光量を測定しようとしたが、これ以上、四ホウ酸ナトリウムを溶解することができず飽和状態であるため、100 mM の濃度を採用した。

これらの結果より、加温温度 45°C、加温時間 4 分、初発 AAPH 濃度 80 mM、ルミノール試薬中のホウ酸緩衝液濃度 100 mM を測定条件（表 1）とした。

表 1 AAPH-CL 法の測定条件

温度	45°C
時間	4 分
AAPH 濃度	80 mM
ホウ酸緩衝液濃度	100 mM

2. 茶の浸出温度・時間によるラジカル捕捉活性の変化

先に求めた測定条件を用いて、雁ヶ音茶の浸出温度や時間により AAPH 由来ペルオキシラジカル捕捉活性の変化を検討した（図 7）。各条件で浸出した茶（液）は、リン酸緩衝液にて 150 倍に希釈して発光抑制率を算出した。どの温度においても浸出時間が長くなるにつれて、ラジカル捕捉活性が高くなる傾向が示された。90、100°C においては 1 分の浸出時間で 90% 前後まで抑制され、その後、抑制率はあまり上がらなかった。一方、80°C 以下の温度では、90、100°C の時より抑制率は高くないが、同じ浸出時間では温度が高い方がラジカル抑制率が高くなる、つまり、測定時間の範囲内で温度依存性が見られた。また、浸出時間が長くなるほど抑制率も上昇していき、時間依存性も見られた。通常、お茶を飲用する場合、沸騰に近い状態のお湯を急須に注ぎ 30 秒前後の浸出により湯のみ茶碗に注いでいると思われるが（場合によってはもっと短い浸出時間で）、図 7 の結果から、もう少し浸出時間を長くすれば、ラジカル捕捉能の高いお茶を

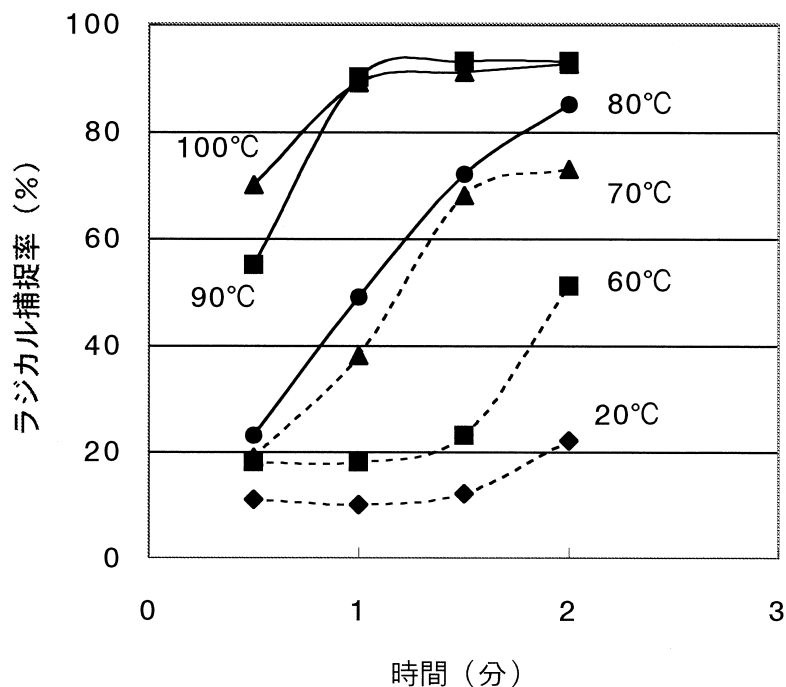


図 7 茶の浸出温度と時間によるラジカル捕捉活性の変化

飲用することが可能と思われる。ただ、浸出時間を長くすれば、渋みや苦みを伴うことが予想され、嗜好面での問題が生じる可能性がある。

3. 茶の官能検査

最初に、浸出時間を一定にして温度別に嗜好調査を行った（表2）。どの浸出時間に関しても、Kramer 検定、Newell & MacFarlane 検定とも有意差を見い出せなかった。これはパネラーに試料を提示した際、熱くてすぐには飲めないなどの制約があり、実際に飲用した際の温度が一定にできなかったこともあり、有意差が真に無かったかどうかは、明確ではないと思われる。

次に、浸出温度を一定にして時間別に嗜好調査を行った（表3）。まず 80℃ 浸出では、Kramer 検定により 120 秒浸出が有意に ($p<0.05$) 最も好まれ、90 秒浸出が逆に有意に ($p<0.05$) 好まれなかった。また、Newell & MacFarlane 検定の解析では、60 秒と 90 秒浸出時間での有意差はなかったが、60 秒と 120 秒の浸出時間では $p<0.05$ 、90 秒と 120 秒浸出時間では $p<0.01$ で嗜好の差があり、80℃の浸出温度では、浸出時間が 120 秒、60 秒、90 秒の順で好まれることがわかった。続いて 90℃浸出では、Kramer 検定により 120 秒浸出が有意に ($p<0.05$) 最も好まれ、60 秒浸出が逆に有意に ($p<0.05$) 好まれなかった。また、Newell & MacFarlane 検定の解析では、60 秒と 90 秒浸出時間、ならびに、90 秒と 120 秒浸出時間での有意差はなかったが、60 秒と 120 秒の浸出時間では $p<0.05$ で嗜好の差があり、90℃ の浸出温度では、Kramer 検定と Newell & MacFarlane 検定では評価が分かれた。ただ、浸出時間が 60 秒と 120 秒では、明らかに 120 秒の浸出時間が好まれる結果となった。最後に、100℃ 浸出では、Kramer 検定および Newell &

表2 浸出時間一定条件下、浸出温度による官能検査（順位法の総和）

浸出時間 (秒)	浸出温度 (°C)			パネラー (人)
	80	90	100	
60	51	40	41	22
90	49	50	45	24
120	49	41	54	24

表3 浸出温度一定条件下、浸出時間による官能検査（順位法の総和）

浸出温度 (°C)	浸出時間 (秒)			パネラー (人)
	60	90	120	
80	52 (2)	57 (3)	35 (1)	24
90	54 (3)	39 (2)	36 (1)	23
100	46 (-)	52 (-)	46 (-)	23

注1) () 内の数値は Kramer 検定による順位 ($p<0.05$)

注2) a、b は、Newell & MacFarlane 検定による $p<0.01$ 、0.05 での有意判定

MacFarlane 検定の解析では、どちらも有意差を見い出せなかった。以上のことから浸出温度を一定にした場合、100℃では有意差は無かったが、80、90℃の浸出温度において、調べた範囲ではより長い浸出時間の方が好まれる傾向にあった。雁ヶ音茶は、葉軸、一般にいう茎の部分を用いているため、呈味成分が抽出しづらく、長い浸出時間が必要かもしれない。今後、更に長い浸出時間での嗜好も検討していきたい。

一般に美味しく茶を飲用するには、水が重要となってくる。なぜなら、茶の香味や色は、水の硬度（カルシウムやマグネシウムイオンの含量）、塩素や鉄に大きく左右されるからである。ミネラル類や鉄はカテキンと反応し味や色に影響を与え、塩素は香りの劣化因子となる。水のこれらの成分が同じとして、今回、加温温度と時間の影響についてラジカル捕捉活性と嗜好調査を行った。茶の呈味成分であるカフェイン、カテキン類、テアニンやグルタミン酸などのアミノ酸類や糖が浸出温度と時間にどのように影響されるかは、既に報告がある¹¹⁾。ラジカル捕捉活性に大きく影響を及ぼすカテキン類は、温度が高く時間が長いほど、茶葉からの溶出量が増える。特に、茶のカテキン類の中で約50%を占めるエピガロカテキンガレートにこの傾向が強い。今回のラジカル捕捉活性の結果から、カテキン溶出量とラジカル捕捉活性とに相関性があることは間違いないであろう。ただ、ラジカル捕捉活性と嗜好との相関性は今回の結果からは得られなかった。浸出時間が長くなれば、ラジカル捕捉活性と嗜好とが高まる傾向がうかがえるが、今回のデータからは断定できなかった。試料の温度管理やパネラーの教育など官能検査の実施方法も今後考慮しなければならない課題である。

茶をいれる条件は湯の温度と時間以外に、茶葉と湯量の関係も大事である。今回は、茶葉1gに対して湯量を100mlと限定した。茶業研究報告の「茶のいれ方研究会」によれば、煎茶の上級で茶葉6gに対して湯量170ml、玉露の上級で茶葉10gに対して湯量60ml（どちらも3人分）が良いとしている¹²⁾。今後、雁ヶ音茶に関しても、成分分析、ラジカル捕捉活性測定とともに、茶葉（葉軸）と湯量の関係についても官能検査を実施する必要があるだろう。また、今回は女子短大生をパネラーとして用いたが、他世代や男性の嗜好も併せて調査する必要も感じている。

IV. 参考文献

- 1) 寺尾純二、五十嵐脩（編）：“フリーラジカルと疾病予防”、建帛社（1997）。
- 2) 吉川敏一（編）：“フラボノイドの医学”、講談社サイエンティフィック（1998）。
- 3) 村上明、森光康次郎（編）：“食と健康—情報のウラを読む—”、丸善（2002）。
- 4) E. Niki: Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, **44**, 227-253 (1987).
- 5) E. Niki: Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radical. *Methods in Enzymology*, **186**, Oxygen radicals in biological systems Part B, eds. by L. Packer and A. N. Glazer. Academic Press Inc., pp. 100-108 (1990).
- 6) T. P. Whitehead, G. H. G. Thorpe, S. R. J. Maxwell: Enhanced chemiluminescence assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Anal. Chim. Acta*, **266**, 265-277 (1992).

- 7) T. Miyazawa, K. Fujimoto, T. Suzuki, and K. Yasuda: Determination of phospholipids hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology*, **233**, Oxygen radicals in biological systems Part C, ed. by L. Packer. Academic Press Inc., pp. 324-332 (1994).
- 8) O. Hirayama, M. Takagi, K. Hukumoto, and S. Katoh: Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. *Anal. Biochem.*, **247**, 237-241 (1997).
- 9) K. Harada, C. Okano, H. Kadoguchi, Y. Okubo, M. Ando, S. Kitao, and Y. Tamura: Peroxyl radical scavenging capability of fish sauces measured by the chemiluminescence method. *Int. J. Mol. Med.*, **12**, 621-626 (2003).
- 10) S. Kitao, K. Fujii, M. Teramoto, K. Harada, M. Ando, and Y. Tamura : Rapid and sensitive method for evaluation of radical-scavenging activity using peroxy radicals derived from 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride combined with luminol chemiluminescence. *Food Sci. Technol. Res.*, **11** in press (2006).
- 11) 山西 貞 (著) : “お茶の科学”、裳華房 (1992).
- 12) 谷本陽蔵 (著) : “緑茶入門”、保育社 (1997).

