

新潟県立看護大学学長特別研究費 平成14年度 研究報告

クメンヒドロペルオキシドを用いた新しい抗酸化能測定法の開発

研究者 杉田 収
新潟県立看護大学 (看護基盤科学)

Development of New Method of Measuring the Antioxidant Activity Using Cumene Hydroperoxide

Osamu Sugita
Niigata College of Nursing

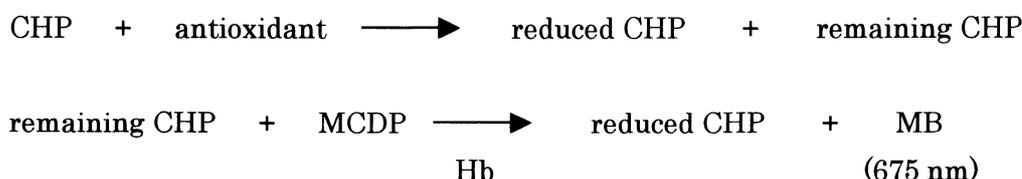
キーワード：抗酸化能 (antioxidant activity), 活性酸素 (active oxygen), クメンヒドロペルオキシド (cumene hydroperoxide), ポリフェノール(polyphenol)

目的

生体に発生する活性酸素は、組織を障害し様々な疾病の原因になると考えられている。なかでも活性酸素種の1つである過酸化脂質は脳血管障害の原因と考えられ、その生成と消去対策が興味を持たれている¹⁾⁵⁾。臨床的には抗酸化能の低下した人が疾病に罹患し易いと予想されることから、様々な疾患患者の血清・血漿中の抗酸化能を測定して診療に役立たせることが本研究の研究目的である。また栄養学の分野では健康を維持するには抗酸化能を有する飲物、食べ物が重要と言われるが⁶⁾、これらの抗酸化能の定量値は見かけない。本研究はワインやお茶等の抗酸化物質が有する抗酸化能を測定し、健康管理法の新たな展開を開拓する可能性を有している。

研究方法

CHP(クメンヒドロペルオキシド)は過酸化脂質と同様に-OOHを有している。本法はCHPの-OOHがポリフェノールやヒト血漿等の還元能力を有する抗酸化物質により、どの程度還元されるかを測定する。還元反応の結果、還元されずに残存したCHPの量を八木らの過酸化脂質定量法⁷⁾⁸⁾で測定する。すなわちCHPと反応するMCDP(10-N-methylcarbamoyl-3,7-dimethylamino-10H-phenothiazin)でメチレンブルー(MB)に導く測定法である。測定原理は以下のとおりである。



試料：エピカテキン、カテキンはシグマケミカル(MO, USA)から、クリシンはアルドリッチケミカル(Miwaukee, USA)から得た。またアピゲニンはカルビオケム・ノババイオケム(CA, USA)から、さらにアスコルビン酸、 α -トコフェロール、ケルセチン、ミリセチン、ルチン、ケンフェロール、ヘモグロビン(Hb)、MOPS、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルは和光純薬(大阪)

からそれぞれ得た。

アピゲニニン, ペラルゴニン, シアニンは Extrasynthese (Genay, France) から, また CHP はナカライタスク (京都) から得た。MCDP, *N,N'*-ジメチルホルムアミド (DMF), 2-メチルベンズイミダゾール (MBI) は協和メデックス (東京) から, ザルコシネート LN はニコル (東京) からそれぞれ供与を受けた。

測定: アスコルビン酸は生理食塩水で溶解したが, それ以外の化学物質は全てエタノールで溶解した。それぞれの化学物質は表の最高濃度を上限に 5~6 ポイントの濃度系列を作成し, 濃度と抗酸化能の関係をみた。各濃度の試料の 30 μ l を試験管に採取し, 500 nmol/ml 濃度の CHP 溶液の 70 μ l を加えた。その後 MBI/Hb/MCDP 混合使用液を 3.0ml 添加して 30°C, 16 分間インキュベートし, 分光光度計の 675nm の波長で吸光度を測定した。試薬ブランクを取り, 標準液は 500 nmol/ml 濃度の CHP 溶液を用いた。

なおこれら試料の検体ブランクは吸光度で 0.000~0.003 であったために省略した。

結果

ポリフェノール類等の抗酸化能:

抗酸化能の数値は化学物質 1 mmol/L 当たりである。結果を表にまとめた。-OH はその化学物質が有するヒドロキシル基の数である。フラボン, フラボノール, アントシアニンに分類される物質では, ヒドロキシル基の数が増加すると抗酸化能も増加する関係が見られた。

Table List of antioxidant compounds and their antioxidant activities

Compound	Concentration ^{*1}	Medium	-OH	Antioxidant activity ^{*2}
Polyphenols				
(Flavones)				
Chrysin	2.5 mmol/L	E	2	1
Apigenin	1.5 mmol/L	E	3	9
Rutin	10.0 mmol/L	E	4	26
(Flavonols)				
Kaempferol	5.0 mmol/L	E	4	100
Quercetin	5.0 mmol/L	E	5	420
Mylicetin	0.5 mmol/L	E	6	988
(Anthocyanidins)				
Apigeninidin	1.0 mmol/L	E	3	89
Pelargonidin	1.0 mmol/L	E	4	800
Cyanidin	1.0 mmol/L	E	5	839
(Tannins)				
Catechin	5.0 mmol/L	E	5	62
Epicatechin	5.0 mmol/L	E	5	66
(Simple phenols)				
Caffeic acid	5.0 mmol/L	E	2	76
Gallic acid	5.0 mmol/L	E	3	220

Other antioxidants				
Ascorbic acid	0.5 mmol/L	P	4	780
α -Tocopherol	2.0 mmol/L	E	1	120
β -Carotene	3.3 mmol/L	E	0	0
Uric acid	0.48 mmol/L	P	(3) ^{*3}	0
Bilirubin	0.34 mmol/L	Alb	0	0
Dithiothreitol	16.0 mmol/L	P	0	0
Glutathione peroxidase	1.67 mKat/L	PB	---	0
Catalase	1.67 mKat/L	PB	---	0
Superoxide dismutase	83.4 μ Kat/L	PB	---	0

^{*1}The highest concentration tested. ^{*2}(μ mol/L) / (mmol/L). ^{*3}Enol form.

E = ethyl alcohol, P = physiological salt solution, Alb = 45 g/L bovine albumin in physiological salt solution, PB = 0.05 mol/L phosphate buffer pH 7.2 solution. Antioxidant activity of zero means that the activity was not detectable at the highest concentration tested.

考察

MBI/Hb/MCDP 混合使用液はきわめて不安定であり、時間の経過と共にブランク値を上昇させた。そのため用事調整で遮光が原則であり、さらに試薬ブランクが常に必要であった。これは空気中の酸素の存在下で微量な還元反応を簡便に測定する本法の避けられない短所と考えられた。

本法で抗酸化物質と認められた物質は、実験を行なった 11 種類全てのポリフェノールであり、またアスコルビン酸と α -トコフェロールであった。一方一般に抗酸化能を有すると考えられている β -カロチン、尿酸、ビリルビン、ジチオスレイトールや酵素のカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼは、本法では抗酸化能は認められなかった。

さらに表に示したように同一の化学構造の骨格であれば、ヒドロキシル基の多い物質ほど高い抗酸化能を示したことから、本法はヒドロキシル基による脂質ヒドロペルオキシドの還元量を測定しているものと考えられた。

結論

化学構造の基本骨格が同一でヒドロキシル基の数が異なるポリフェノールでは、ヒドロキシル基数の多い物質ほど本法では高い抗酸化能を示した、このことから本法はポリフェノールのヒドロキシル基によって脂質ヒドロペルオキシドを還元する量を測定しているものと考えられた。

(なおこの報告文の詳細は雑誌 *Annals of Clinical Biochemistry* に投稿中である)

文献

- 1) Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218-20.
- 2) Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, et al. Dietary antioxidant flavonoids and the risk of

coronary heart disease. The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-11.

- 3) Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995; 155: 381-6.
- 4) Blázovics A, Kovács Á, Lugasi A, et al. Antioxidant defense in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn disease and ulcerative colitis: a chemiluminescent study. *Clin Chem* 1999; 45: 895-6.
- 5) Sies H (ed.). *Oxidative Stress –oxidants and antioxidants–: towards clinical medicine*. New York: Academic Press; 1991. p. 493-616.
- 6) Liu ZQ, Ma LP, Zhou B, et al. Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein. *Chem Phys Lipids* 2000; 106: 53-63.
- 7) Ohishi N, Ohkawa H, Miike A, et al. A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative. *Biochem Int* 1985; 10: 205-11.
- 8) Yagi K, Kiuchi K, Saito Y, et al. Use of a new methylene blue derivative for determination of lipid peroxides in foods. *Biochem Int* 1986; 12: 367-71.