

コーヒー中の微量元素とスーパーオキシド消去活性

辻 昭博¹⁾・松下 緑治²⁾・高田 実弥²⁾・佐野 由幸¹⁾・桜井 弘¹⁾
(¹⁾京都薬大・代謝分析*, (²⁾京大原子炉***)

Superoxide Anion Scavenging Activity and Metal Contents of Coffee

Akihiro TSUJI^a, Rokuji MATSUSHITA^b, Jitsuya TAKADA^b, Yoshiyuki SANO^a and Hiromu SAKURAI^a

^aDepartment of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, and

^bNuclear Reactor Institute, Kyoto University

Superoxide anion radical is proposed to cause oxidative injury to cells and tissues due to the successive formations of more reactive oxygen species such as hydrogen peroxide and hydroxyl radicals.

Coffee that contains both polyphenols like tannins and metalloproteins like superoxide dismutases (SOD) is highly expected to scavenge the active oxygen species such as superoxide anion radicals.

We studied both superoxide anion scavenging activity (SSA) and metal contents of coffee, by evaluating with ESR (electron spin resonance)-spin trapping and neutron activation analysis (NAA) together with flameless atomic absorption (FAA) methods, respectively.

Coffees imported from different countries were found to have SSA in the range of 470-1360 SOD unit/ml of coffee extract, showing that almost coffees examined have relatively good SSA. Nineteen sorts of elements were detectable by both NAA and FAA methods, depending on the kind of coffee. A correlation between SSA and the metal ratio Mn/Fe was found, indicating the occurrence of SOD-like activity of coffee.

分子状酸素の活性型であるスーパーオキシドアニオンラジカルは、過酸化水素やヒドロキシルラジカルに変換され細胞や組織に酸化的障害を引き起こすことが知られている¹⁻³⁾。

コーヒーは第二次世界大戦後に急速に日本人の間に広まり、現在国民一人当たり年間に300杯のコーヒーを飲んでおり、世界第3位のコーヒー消費大国になっている。コーヒーはタンニン⁴⁾のようなポリフェノールやクロロゲン酸を含んでいることが知られており、最近ではスーパーオキシドジスムターゼ様の金属蛋白質を含んでいることが報告されている⁵⁾。また、インスタントコーヒー中の金属含量も報

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒606)

**所在地：大阪府泉南郡熊取町野田 (〒590-04)

告されている⁶⁾。

これらの観点から、我々は、原産地の異なる種々のコーヒーを作成し、スーパーオキシドアニオン消去活性 (SSA) を DMPO を用いた ESR スピントラップ法により測定した⁷⁻⁹⁾。一方、サンプルを湿式灰化して、原子吸光法により鉄、銅、亜鉛およびマンガン含量を測定した。また、種々のコーヒー豆に含まれる微量元素を中性子放射化分析法および原子吸光法により測定した。その結果、コーヒー中にはスーパーオキシドアニオンを消去する酵素 (SOD) の活性中心に存在する金属 (鉄、銅、亜鉛およびマンガン) が含まれていることを見出した。SSA と含有金属の相関性について考察を加えた。

実験方法

1. 市販のコーヒー豆から、通常飲用時の濃度で抽出したコーヒーのスーパーオキシドアニオン消去活性を DMPO (ジメチル-ピロリン-N-オキシド) を用いた ESR スピントラップ法により測定した。サンプルの消去活性は、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (HPX-XOD) 系によって発生したスーパーオキシドアニオンラジカルの50%消去濃度 (IC₅₀) として評価した。

2. 市販のコーヒー豆をコーヒーミルで粉碎し、100mg 中の含有元素量を測定した。ただし、銅および鉄含有量は、硝酸で湿式灰化した後、適宜希釈して原子吸光法にて測定した。コーヒー粉末中のその他の元素含量については、中性子放射化分析法により定量した。さらに、SSA 活性測定に用いたサンプルを湿式灰化し適宜希釈して、鉄、銅、亜鉛およびマンガン含量を原子吸光法で測定した。

結 果

1. スーパーオキシドアニオン消去活性

DMPO 用いた ESR スピントラップ法により、種々のコーヒーのスーパーオキシドアニオン消去活性 (SSA) を測定した。また、ルイボスティーおよび日本茶の玉露を常法により作成し、SSA を測定した。消去活性は、HPX-XOD 系によって発生したスーパーオキシドアニオンを50%消去する濃度 (IC₅₀) で評価した (Table 1)。測定されたコーヒーの IC₅₀ は約260-750 $\mu\text{g/ml}$ であることが判明した。

2. 中性子放射化分析法によるコーヒー中の元素含量

種々のコーヒー粉末中の元素を測定するために、中性子放射化分析を行った。相対的にカリウム、マグネシウム、コバルトおよびカルシウムが多く含まれており、コーヒー豆100mg あたり平均するとそれぞれ4.5mg, 480 μg , 430 μg および290 μg であった。また、SSA が期待される鉄、銅、亜鉛およびマンガンの4種の元素含量はそれぞれ、0.34 μg , 0.42 μg , 0.50 μg および6.49 μg であった (Table 2)。

3. 原子吸光法によるコーヒー中の鉄、銅、亜鉛、マンガン含量

コーヒー中の鉄、銅、亜鉛およびマンガン含量を原子吸光法により測定した。これら4種の金属イオンはスーパーオキシドアニオンを消去する酵素 (SOD) の活性中心に含まれている。従って、これら4種の金属イオンの存在は SOD 様活性の発現が期待される。4種の金属イオンの平均含量は銅、亜鉛、鉄、マンガンの順に、コーヒー豆100mg 当たり0.08 μg , 0.13 μg , 0.27 μg および0.58 μg であった (Table 3)。

Table 1. Superoxide anion scavenging and SOD-like activities of coffees

Type of coffee	Brand	IC ₅₀ ±S.D. (μg/ml)	SOD-Like activity ± S.D. (SOD unit/ml)
Powder coffee	Kilimanjaro	746±67	473±56
	Mandarin	685±110	511±82
	Santos	575±97	612±103
	Bluemountain	472±116	745±184
	Mocha	352±122	997±348
	Jamaica	298±91	1186±359
	Colombia	259±33	1361±166
Instant coffee	Kilimanjaro	217±21	464±46
	Mocha	168±7	601±25
Others	Rooibos tea	833±201	21±5
	Gyokoro	154±42	7340±2058

Values are means ± S.D.s for three experiments.

考 察

我々は、原産地の異なる国々から輸入したコーヒーのスーパーオキシドアニオン消去活性 (SSA) を測定した。測定された7種のコーヒーの SSA は次のような順序であった。コロンビア>ジャマイカ>モカ>ブルーマウンテン>サントス>マンデリン>キリマンジャロ (Table 1)。コロンビアの SSA 活性は IC₅₀ で評価して、キリマンジャロの約3倍であった。調べたコーヒーの SSA 活性は470-1360 SODunit/ml の範囲にあり、ルイボスティーと比較して良好な SSA 活性を示したが、日本茶の玉露よりも活性は劣っていた。

また、コーヒー豆中の元素含量を測定した結果、次のような元素を検出した。Na, K, Rb, Cs, Mg, Ca, Al, Cl, Br, Sc, V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, La および Ce。ほとんどのコーヒー豆は他の植物と比較して、Co, Fe, Cr および Sc が著しく蓄積していた¹⁰⁾。なお、調べたコーヒー粉末中の Co および Sc 濃度は他の植物に比べ、約10,000倍以上濃縮されていた。しかし、モカでは、Cs および Co は検出されず、ジャマイカでは Cs は検出されなかった。モカやサントスでは La が検出されたが、Ce はサントスでのみ検出された。

一方、コーヒー溶液中の4種の金属イオン (鉄, 銅, 亜鉛およびマンガン) を測定した。これら4種の金属イオンはスーパーオキシドアニオンを消去する酵素である SOD の活性中心に含まれている¹¹⁻¹³⁾。したがって、これら4種の金属イオンの存在はコーヒーの SOD 様作用と相関をもつ可能性があるかもしれない。我々はコーヒーの SSA と金属含量なし、それらの比率との間に相関性を見出した。

Fig. 1 に示されるように、SSA と Mn/Fe 比との間に相関性が見出され、7種のコーヒーに対する相関係数は0.76であった。この結果はコーヒーの SSA 活性が、部分的にその金属含有比に依存していることを示している。実際に、コーヒー中の Cu, Zn-, Fe- および Mn-SOD の存在が報告されている⁵⁾。

Table 2. Concentrations of the elements in coffees, as determined by NAA method

Type of coffee	Brand	Na	K	Rb	Cs	Mg	Ca	Al	Cl	Br
Instant coffee	KILIMANJARO	894	109000	11.5	0.26	8280	3450	83.7	1510	4.22
		38.9	2788	1.35	0.01	341	86.1	3.10	42.6	0.1
	MOCHA	6764	102000	93.6	0.26	7450	3710	83.4	1420	5.62
		29.4	2609	1.10	0.01	307	92.6	3.09	40.1	0.07
Powder coffee	COLOMBIA	19.4	41400	21.5	0.09	4330	3120	64.2	347	20.2
		0.84	1059	0.25	0.002	178	77.8	2.38	9.79	0.25
	JAMAICA	45.6	47600	18	n.d.	5430	4200	53.5	662	0.89
		1.98	1217	0.21	n.d.	223	105	1.98	18.7	0.01
	KILIMANJARO	18.1	41200	65	0.04	4810	2300	52.5	276	8.98
		0.79	1054	0.76	0.001	198	57.4	1.95	7.79	0.11
	MANDARIN	17.5	43800	69.1	0.14	4310	2120	110	285	22
		0.76	1120	0.81	0.003	177	52.90	4.08	8.04	0.28
	MOCHA	21.1	44700	29.2	n.d.	4610	2660	167	324	6.29
		0.92	1143	0.34	n.d.	190	66.4	6.19	9.14	0.08
	SANTOS	14.5	52500	35.8	0.06	5240	2830	75.5	556	12.1
		0.63	1343	0.42	0.001	216	70.6	2.80	15.7	0.15
Others	ROOIBOS TEA	2300	2600	5.5	0.041	2200	1700	140	2700	27

Brand	Sc	V	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	La	Ce
KILIMANJARO (INSTANT)	<0.01	n.d.	22	75.1	410	8290	36.8	4.39	n.d.	n.d.
	<0.001	n.d.	0.42	1.37	7.34	140.67	0.58	0.07	n.d.	n.d.
MOCHA (INSTANT)	92.7	0.31	19.5	83.4	372	5380	32.2	3.36	n.d.	n.d.
	2.06	0.006	0.38	1.52	6.66	91.3	0.51	0.05	n.d.	n.d.
COLOMBIA	74	n.d.	17.9	73	355	5510	488	6.67	n.d.	n.d.
	1.65	n.d.	0.34	1.33	6.36	93.5	7.68	0.10	n.d.	n.d.
JAMAICA	29.9	n.d.	13.3	74.5	351	4680	539	5.15	n.d.	n.d.
	0.7	n.d.	0.26	1.36	6.29	79.4	8.48	0.08	n.d.	n.d.
KILIMANJARO	n.d.	n.d.	21.2	84.3	339	5060	355	3.96	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	0.41	1.53	6.07	85.9	5.59	0.06	n.d.	n.d.
MANDARIN	<0.01	n.d.	18.7	45.8	327	2250	352	4.47	n.d.	n.d.
	<0.001	n.d.	0.36	0.83	5.86	38.2	5.54	0.07	n.d.	n.d.
MOCHA	133	n.d.	17.8	42.7	325	n.d.	245	4.39	0.08	n.d.
	2.96	n.d.	0.34	0.78	5.82	n.d.	3.86	0.07	0.001	n.d.
SANTOS	72.2	n.d.	23.8	68.9	320	4000	548	5.2	0.73	0.86
	1.61	n.d.	0.46	1.25	5.73	67.9	8.62	0.08	0.005	0.01
ROOIBOS TEA	0.022	0.22	0.22	59	110	0.088	<6.8	5.8	0.31	0.58

n.d. = not detected, upper value : $\mu\text{g/g}$ coffee powder, lower value : $\mu\text{mol/g}$ coffee powder

Table 3. Concentrations of Fe, Cu, Zn and Mn in the extracted coffee solutions

Brand	Fe	Cu	Zn	Mn
BLUEMOUNTAIN	2.76	0.56	0.61	5.94
	0.049	0.009	0.009	0.108
COLOMBIA	2.18	0.68	1.52	6.14
	0.039	0.011	0.023	0.112
JAMAICA	2.92	0.56	0.68	6.30
	0.052	0.009	0.010	0.115
KILIMANJARO	3.02	0.78	1.70	5.64
	0.054	0.012	0.026	0.103
MANDARIN	2.52	0.73	1.49	5.04
	0.045	0.012	0.023	0.092
MOCHA	2.38	1.06	1.73	5.08
	0.043	0.017	0.026	0.092
SANTOS	2.78	1.23	1.14	6.28
	0.050	0.019	0.017	0.114

upper value : $\mu\text{g/g}$ coffee powder, lower value : $\mu\text{mol/g}$ coffee powder

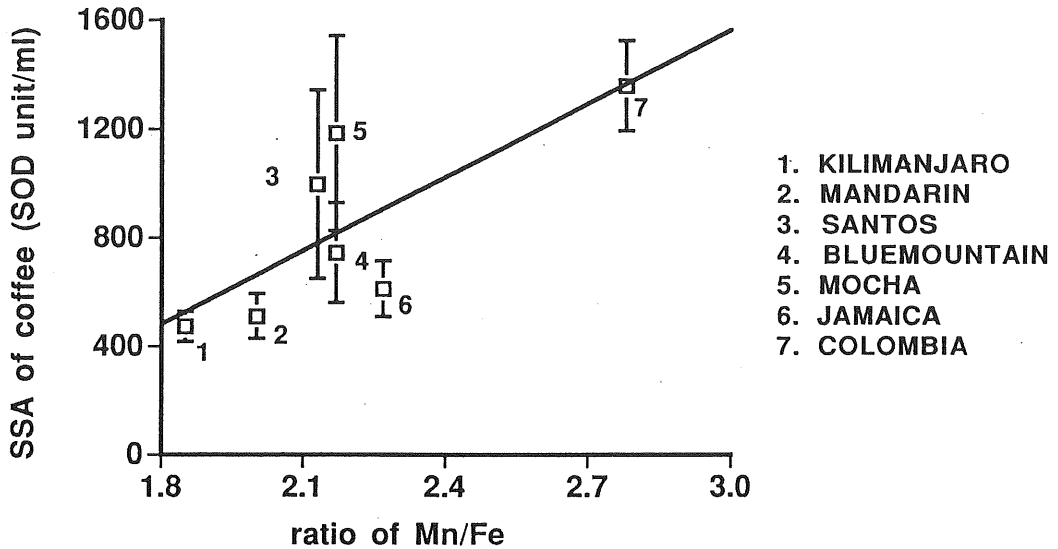


Fig. 1 The correlation between the superoxide anion scavenging activities (SSA) and the ratio of Mn/Fe

Linear correlation was found to be $y = 904x - 1144$ ($r = 0.762$).

参 考 文 献

- 1) I. Emerit, L. Packer, C. Auclair, eds., "Antioxidants in Therapy and preventive Medicine (1990),

Plenum Press, New York.

- 2) M. Kondoh, (ed.), "Free Radical," Medical View Publications, Tokyo (1992), pp. 46-54.
- 3) H. Sakurai and K. Kikugawa, eds., "Free Radicals and Drugs," Hirokawa Publishing (1991)
- 4) T. Hatano, R. Edamatsu, M. Hiramatsu, A. Mori, Y. Fujita, et al., Chem. Pharm. Bull. 37, 2016-2021 (1989)
- 5) M. C. Daza, L. M. Sandalio, M. Quijano-Rico and L. A. Delrio, J. Plant Physiol., 141, 521 (1993)
- 6) C. Minoia, E. Sabbioni, A. Ronchi, A. Gatti, R. Pietra, A. Nicolotti, S. Fortaner, C. Balducci, A. Fonte and C. Roggi, Sci. Total Environ., 141, 181-195 (1994)
- 7) K. Mitsuya, Y. Mizuta, M. Kohno, M. Hiramatsu and A. Mori, Bull. Chem. Soc. Jpn., 63, 187 (1990)
- 8) G. R. Buetter, Free radicals Biol. Med., 3, 259-303 (1987)
- 9) S. Kitagawa, H. Fujisawa and H. Sakurai, Chem. Pharm. Bull., 40, 304 (1992)
- 10) H. Sakurai and H. Tanaka, eds., "Bio-trace Elements," Hirokawa Publishing (1994)
- 11) H. D. Rabinowitch and I. Fridovich, Photochem. Photobiol., 37, 679-690 (1983)
- 12) J. M. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem. 244, 6049-6055 (1969)
- 13) I. Fridovich, Arch. Biochem. Biophys. 247, 1-11 (1986)