

PEAT MOSHONAKA HUMAN HUMIC SUBSTANCES ANTIOXIDATIVE ACTIVITY (1)

立花陽子, 堀部紗世, 田和理市
(広島国際大学薬学部・薬物生体分析学教室*)

Studies of the Antioxidative Activities of Humic Substances in Peat (1)

Yoko TACHIBANA, Sayo HORIBE and Riichi TAWA

Laboratory of Medicinal and Biochemical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Science,
Hiroshima International University

Summary

Humic acid (HA) and fulvic acid (FA) were prepared from peat and they had high total polyphenol contents (HA: 421 mg/g and FA: 299 mg/g). Antioxidative activity assays were carried out as following: (1) scavenging activities for 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, (2) inhibitory effect on oxidation of linoleic acid, (3) inhibitory effect on 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced hemolysis of rabbit erythrocytes *in vitro*, and (4) effect on Cu²⁺-mediated conjugated dienes formation in human low density lipoprotein (LDL). Both of HA and FA showed relative activities against (1)-(3). That is, (1) HA and FA showed about 90 % of scavenging activities for DPPH radical at the concentration of 250 µg/ml, (2) at the concentration of 81 µg/ml, HA and FA showed inhibitory effect on oxidation of linoleic acid 57 % and 27 %, respectively, (3) HA as well as ascorbic acid (AA) showed about 90 % of inhibitory effect on AAPH-induced hemolysis of rabbit erythrocytes (at the concentration of 67 µg/ml), and (4) HA inhibited Cu²⁺-mediated conjugated dienes formation in human LDL with the dose dependently. The inhibition mechanism by HA was suggested to be different from that of AA.

腐植物質は植物の腐植により生じる有機物質であり、世界各地に分布する泥炭の主成分である。アルカリおよび酸に対する溶解性からフミン酸 (HA)、フルボ酸 (FA) およびヒューミンに分けられている。いずれも高分子電解質の不均一な混合物であり、物理的、化学的および生物学的に多様な作用が認められている^{1, 2)}。腐植物質の医療分野における有効利用を目指して、北海道産PEAT MOSHONAKAからHAおよびFAを調製し、総ポリフェノール量、UV、IRスペクトルおよび高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) による分子量分布について報告した³⁾。HAおよびFA共に高い総ポリフェノール含量が認められたので、(1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能、(2) thiobarbituric acid (TBA) 法によるリノール酸酸化抑制能、(3) 赤血球溶血阻止能の抗酸化活性試験により、抗酸化能を評価した。また、HAについては (4) low density lipoprotein (LDL) 酸化抑制能についても検討した。

実験方法

1. HAおよびFAの調製

HAおよびFAの調製は、北海道産PEAT MOSHONAKAから国際腐植物質学会 (IHSS) 法に従って行った^{3, 4)}。総ポリフェノールの定量は、フォリン-デニス法に従って gallic acid (GA) を標準物質として行い、421 ± 26 mg/g (HA) および299 ± 19 mg/g (FA) であった³⁾。

*所在地：呉市広古新開5-1-1 (〒737-0112)

2. DPPHラジカル消去法⁵⁾

200 mM 2-morpholinoethanesulphonic acid (MES) 緩衝液 (pH6.0) 50 μ l, 20%エタノール 50 μ l および 0.01 M NaOH/80%エタノールに溶解した試料 50 μ l に, 400 μ M DPPH 50 μ l を添加攪拌し, 20分後 520 nm における吸光度を測定した。各濃度の2試料について測定を行い平均値を用いて DPPH ラジカル消去能を次の式で算出した。

$$\text{活性 (\%)} = \{ 1 - (\text{試料溶液の吸光度}) / (\text{対照溶液の吸光度}) \} \times 100$$

試料の代わりに 0.01 M NaOH/80%エタノールを用いたものを対照溶液とし, 標準物質として trolox (Calbiochem) を用いた。

3. TBA法によるリノール酸酸化抑制能の測定^{6,7)}

1.3%リノール酸/エタノール 0.5 ml, 80%エタノール 0.2 ml, 46.4 mM 2,2'-azobis (2-amidino propane) dihydrochloride (AAPH) 水溶液 40 μ l に 0.2 M リン酸緩衝液 (PB) (pH 7.0) に溶解した試料 0.5 ml を加え, 40°C で 3日間遮光して反応させた。反応液 0.2 ml に 8.1% SDS 0.2 ml, 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 1.5 ml, 0.8% 2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol (BHT) 50 μ l, 0.8% TBA 1.5 ml および蒸留水 0.6 ml を加えた後, 沸騰水中で 30分間加熱し, 冷却後 532 nm における吸光度を測定した。1回の実験において各濃度の3試料について測定を行い, 各3~4回の平均値と標準誤差で結果を表した。リノール酸酸化抑制能は次の式で算出した。

$$\text{活性 (\%)} = \{ 1 - (\text{試料溶液の吸光度}) / (\text{対照溶液の吸光度}) \} \times 100$$

試料の代わりに 0.2 M PB (pH 7.0) を用いたものを対照溶液とし, 標準物質として BHT を用いた。

4. 赤血球溶血阻止能の測定

赤血球溶血阻止試験は, ウサギ赤血球 (日本バイオテスト) を用いて以下のように行った⁸⁾。ウサギ赤血球に4倍量のリン酸緩衝食塩水 (PBS) を加え, ゆっくり攪拌後, 1500 g で 10分間遠心分離し, 沈殿した赤血球を集めた。この操作を3回繰り返し, 最後に4倍量の PBS に懸濁した赤血球を溶血試験に用いた。赤血球懸濁液 0.5 ml, PBS に溶解した試料溶液 0.5 ml および PBS に溶解した 200 mM AAPH 0.5 ml を褐色瓶に入れ, ゆっくりと攪拌しながら 37°C で 3時間インキュベーションした。反応液 0.5 ml に PBS 4 ml を加え, 攪拌後 1500 g で 5分間遠心分離し, その上清の 540 nm における吸光度を測定した。1回の実験において各濃度の3試料について測定を行い, 各5~7回の平均値と標準誤差で結果を表した。赤血球溶血阻止能は次の式で算出した。

$$\text{阻害活性 (\%)} = \{ 1 - (\text{試料溶液の吸光度}) / (\text{対照溶液の吸光度}) \} \times 100$$

試料の代わりに PBS を用いたものを対照溶液とし, 標準物質として ascorbic acid (AA) を用いた。

5. LDL酸化抑制能の測定

LDL酸化抑制試験はヒト LDL を用いて以下のように行い, lag time を求めた⁹⁾。ヒト LDL (Biomedical Technologies Inc.) は PBS で透析後, Bradford 法¹⁰⁾ でタンパク質の定量を行い 400 μ g/ml に調製した。その 100 μ l に PBS に溶解した試料溶液 80 μ l を加え, さらに 40 μ M CuCl₂ 水溶液 20 μ l を添加後, 37°C に保ち, 共役ジエンの生成により増加する 234 nm における吸光度を 5分ごとに測定した (Molecular Device Corp., Spectra Max 190)。各濃度の試料溶液について, 234 nm における吸光度の増加 (CuCl₂ 水溶液添加時の吸光度 - CuCl₂ 水溶液無添加時の吸光度) を経時的に表し, lag time および吸光度の増加量により評価した。試料の代わりに PBS を用いたものを対照溶液とし, 標準物質として AA を用いた。

結果および考察

北海道産ピートモスから調製した HA および FA には, (1) DPPH ラジカル消去能, (2) TBA 法によるリノール酸酸化抑制能, (3) 赤血球溶血阻止能のすべてにおいて抗酸化能が認められた。

(1) HA の DPPH フリーラジカル消去能は 50 μ g/assay (250 μ g/ml) で約 90% を示し, FA も HA と同程度の消去能を示した (Fig. 1)。

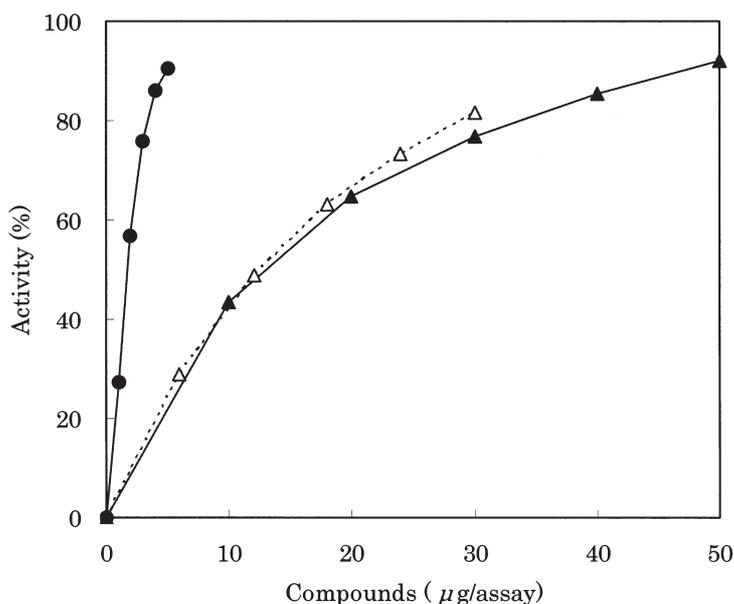


Fig. 1 Scavenging activities for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. A solution of 400 μM DPPH (50 μl) was added to the mixture of 200 mM MES buffer (50 μl), 20 % ethanol (50 μl) and 0.01 M NaOH/80 % ethanol (50 μl) containing varying amount of test compound. The absorbance of the mixture was measured at 520 nm after 20 min. ▲, humic acid; △, fulvic acid; ●, trolox.

(2) TBA法によるリノール酸酸化抑制能において、100 μg/assay (81 μg/ml) の濃度では、HA (57%) はFA (27%) の約2倍の酸化抑制能を示したが、標準物質として用いたBHT (88%) はこれらより強い酸化抑制能を示した (Table 1)。

(3) 赤血球膜が酸化されると、膜の破損が生じ溶血がおこる。そこで赤血球膜に対する抗酸化能を評価するために、ウサギ赤血球を用い、AAPHによる酸化に対する溶血阻止能を調べた。その結果、HAの溶血阻止能は標準物質として用いたAAに匹敵し、100 μg/assay (67 μg/ml) で約90%であったが、FAはそれよりやや弱かった (70%) (Fig. 2)。

(1) ~ (3) の抗酸化能評価において、HAはFAと同等、またはより強い活性を示した。この結果により、それぞれの総ポリフェノール含量が活性に強く相関していることが示唆された。

(4) 酸化変性LDLはLDL受容体によって取り込まれなくなり、動脈硬化の原因となることが知られている。LDLの酸化に伴って起こる共役ジエンの生成により234 nmにおける吸光度が増加するので、酸化剤添加後の234 nmにおける吸光度の経時変化からlag timeを求め、ヒトLDLに対する酸化抑制効果を評価することができる。標準物質として用いたAA溶液 (1, 2, 4, 8 μM) の234 nmにおける吸光度の経時変化をFig. 3に示した。これから得られたlag timeはそれぞれ39分、44分、69分、108分で、対照溶液のlag time (38分) に比べ、溶液濃度の増加に相関して永くなった。一方、HAの吸光度の経時変化はFig. 4に示すように、2.5, 5.0, 10.0 μg/mlの濃度においてlag timeはそれぞれ42分、46分、

Table 1 Antioxidative activity for oxidation of linoleic acid

	Inhibitory effect (%) ²⁾	
	50 μg	100 μg
Humic acid	46.4 ± 3.3	56.6 ± 5.7
Fulvic acid	6.6 ± 7.6	27.2 ± 2.2
BHT ¹⁾	84.5 ± 4.8	87.8 ± 4.2

¹⁾: 2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol

²⁾: The values are means ± SE (*n* = 3-4).

69分と永くなった。さらに、10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では吸光度の増加が対照溶液より小さく、濃度依存的にLDLの酸化に伴って起こる共役ジエンの生成を阻害した。HAでは共役ジエンの生成そのものが抑制されていることから、AAとは異なった作用機序で酸化抑制が起きていることが示唆された。

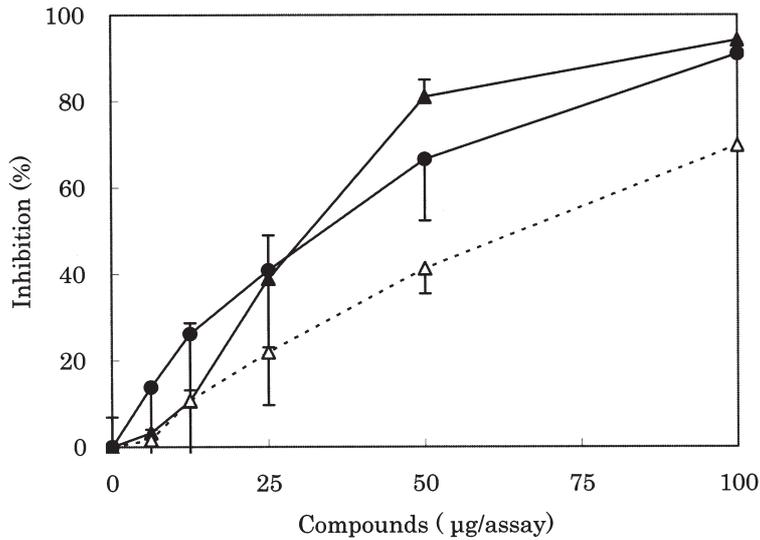


Fig. 2 Inhibitory effect on 2,2'-azobis (2-amidino propane) dihydrochloride (AAPH)-induced hemolysis of rabbit erythrocytes *in vitro*. A mixture of rabbit erythrocyte suspension (0.5 ml), phosphate-buffered saline (PBS) (0.5 ml) containing varying amount of test compound and 200 mM AAPH (0.5 ml) was incubated at 37°C for 3 hr. Aliquot (0.5 ml) of mixture was diluted with PBS (4 ml) and centrifuged at 1500 g for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. \blacktriangle , humic acid; \triangle , fulvic acid; \bullet , ascorbic acid. Data are expressed as mean \pm SE ($n = 3-4$).

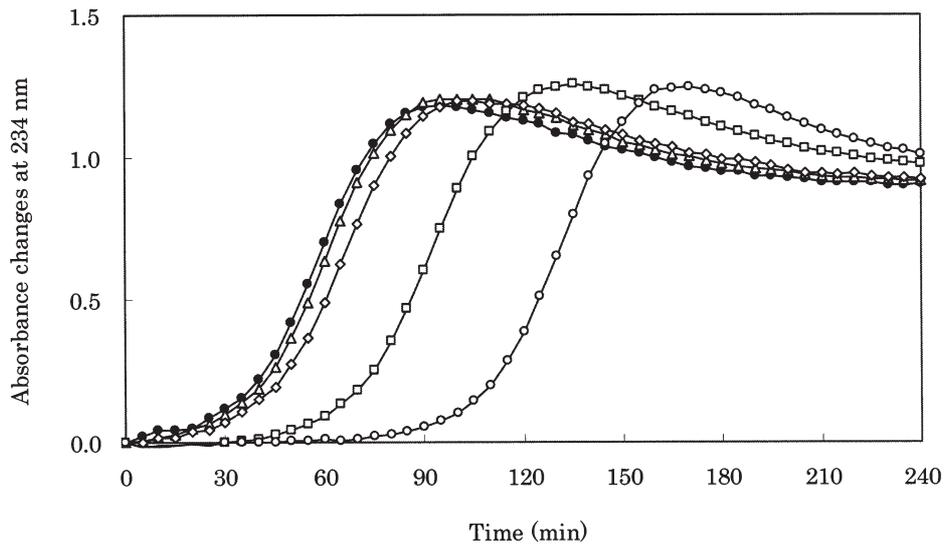


Fig. 3 Effect of ascorbic acid (AA) on Cu^{2+} -mediated conjugated dienes formation in human low density lipoprotein (LDL). A mixture of LDL (40 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) and PBS (80 μl) containing varying amount of AA was incubated at 37°C. After the addition of 40 μM CuCl_2 (20 μl) to the mixture, the absorbance at 234 nm was monitored at intervals of 5 min for 240 min. \bullet , control; \triangle , 1 μM ; \diamond , 2 μM ; \square , 4 μM ; \circ , 8 μM .

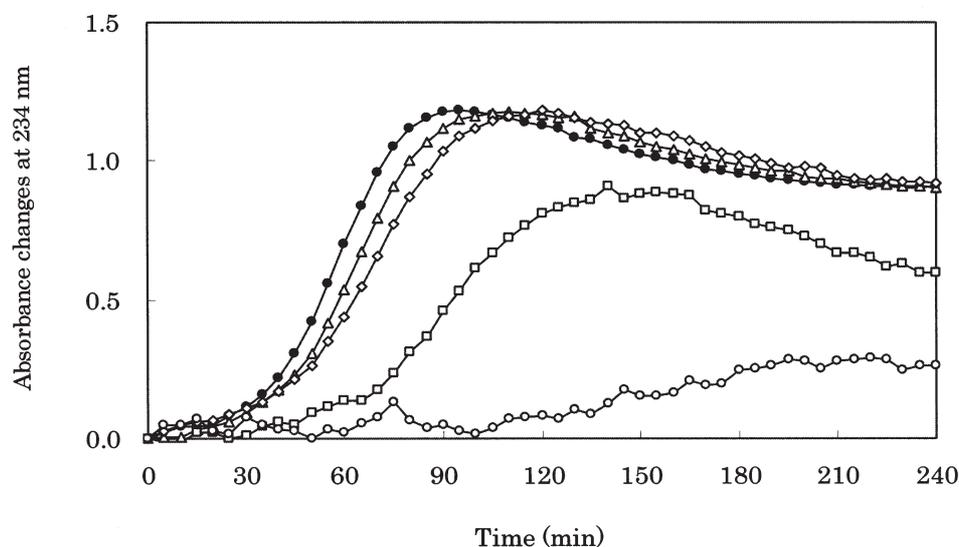


Fig. 4 Effect of humic acid (HA) on Cu^{2+} -mediated conjugated dienes formation in human low density lipoprotein (LDL). A mixture of LDL ($40 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) and PBS ($80 \mu\text{l}$) containing varying amount of HA was incubated at 37°C . After the addition of $40 \mu\text{M}$ CuCl_2 ($20 \mu\text{l}$) to the mixture, the absorbance at 234 nm was monitored at intervals of 5 min for 240 min. ●, control; △, $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$; ◇, $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$; □, $10.0 \mu\text{g}/\text{ml}$; ○, $20.0 \mu\text{g}/\text{ml}$.

参考文献

- 1) 山田バリーダ, 阿相圭介, 矢沢勇樹, 山口達明 (2002) 草炭, 風化炭から抽出したフミン酸, フルボ酸の植物生理活性効果, 土肥誌 73 : 777-781.
- 2) Paolis F D, Kukkonen J (1997) Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere* 34: 1693-1704.
- 3) Tachibana Y, Tawa R (2005) Preparation and characterization of humic substances in peat. *Trace Nutrients Res* 22: 111-115.
- 4) Swift R S (1996) Organic matter characterization. in *Method of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*, ed. by Sparks D L, Page A L, Helmke P A, Loeppert R H, Soltanpour P N, Tabatabai M A, Johnson C T, Summer M E, Soil Sci Soc Am, Madison: pp.1018-1020.
- 5) Oki T, Masuda M, Kobayashi M, Nishiba Y, Furuta S, Suda I, Sato T (2002) Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *J Agric Food Chem* 50: 7524-7529.
- 6) Ohkawa H, Ohnishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
- 7) Osawa T, Namiki M (1981) A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric Biol Chem* 45: 735-739.
- 8) Miki M, Tamai H, Mino M, Yamamoto Y, Niki E (1987) Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol. *Arch Biochem Biophys* 258: 373-380.
- 9) Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M (1989) Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comms* 6: 67-75.
- 10) Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.