

## Antioxidant の作用機構—過酸化脂質の生成阻害における還元力の役割

村上 恵子, 松田 芳和\*, 中塚 正博\*, 吉野 昌孝

(愛知医大・生化, \*日本クリニック・中研)

### Mechanism of Antioxidant Action of Flavonoids and Polyphenolics

Keiko Murakami<sup>1</sup>, Yoshikazu Matsuda<sup>2</sup>, Masahiro Nakatsuka<sup>2</sup> and Masataka Yoshino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Aichi Medical University, Nagakute, Aichi 480-11,

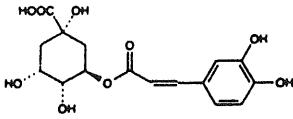
<sup>2</sup>Central Laboratory, Japan Clinic Co., Kyoto, Japan

Antioxidant action of flavonoids and polyphenolics was analyzed. Flavonoids including baicalein, baicalin, quercetin and rutin with little or no reducing activity enhanced the autooxidation of  $\text{Fe}^{2+}$ , and further inhibited the ascorbate-mediated reduction of iron. On the contrary, polyphenolics belonging to non-flavonoids such as protocatechuic acid and chlorogenic acid showed a potent iron-reducing ability, and prevented  $\text{Fe}^{2+}$  ion from autooxidation completely. Both flavonoids and non-flavonoids effectively inhibited the formation of thiobarbituric acid-reactive substances as a marker of lipid peroxidation of microsomes from rat liver.

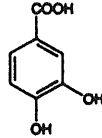
Flavonoids acted as antioxidants, which inhibit the formation of superoxide and hydroxyl radical by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  ion acting as prooxidant. On the other hand, antioxidant properties of non-flavonoids can be explained by the formation of inactive  $\text{Fe}^{2+}$ -polyphenolic complex, which cannot react with oxygen. Oxidation-reduction properties of iron was applied to analyze the extract of oyster, *Crassostera gigas*. The oyster extract protected the  $\text{Fe}^{2+}$  from autooxidation, but showed inhibition of the ascorbate-induced reduction of iron. Oyster extract showed a potent inhibitory effect on lipid peroxidation of microsomes. These results suggest that two types of antioxidant, that is, flavonoid and non-flavonoid types play a central role in antioxidant action of oyster extract.

活性酸素の生成機構は多様であるが多くの場合、遷移金属（主として Fe, Cu）の存在によって促進される<sup>1)</sup>。抗酸化物質の作用機構の少なくとも一つは、金属イオンによる活性酸素の生成を阻止することだと考えられる<sup>2)</sup>。本研究ではポリフェノール、フラボノイド及びビタミン E と鉄イオンとの相互作用と活性酸素生成阻害機構の関連を解析し、カキ肉エキス中の同様な効力を持つ物質について報告する。

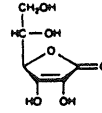
Chlorogenic acid



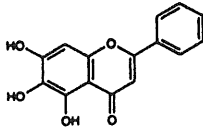
Protocatechuic acid



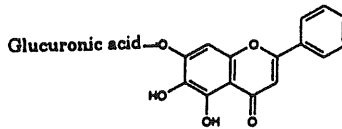
Ascorbate



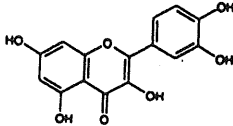
Baicalein



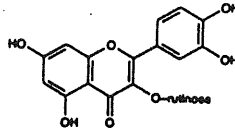
Baicalin



Quercetin



Rutin



Scheme. Structure of antioxidants

## 方 法

### 過酸化脂質生成阻止効果

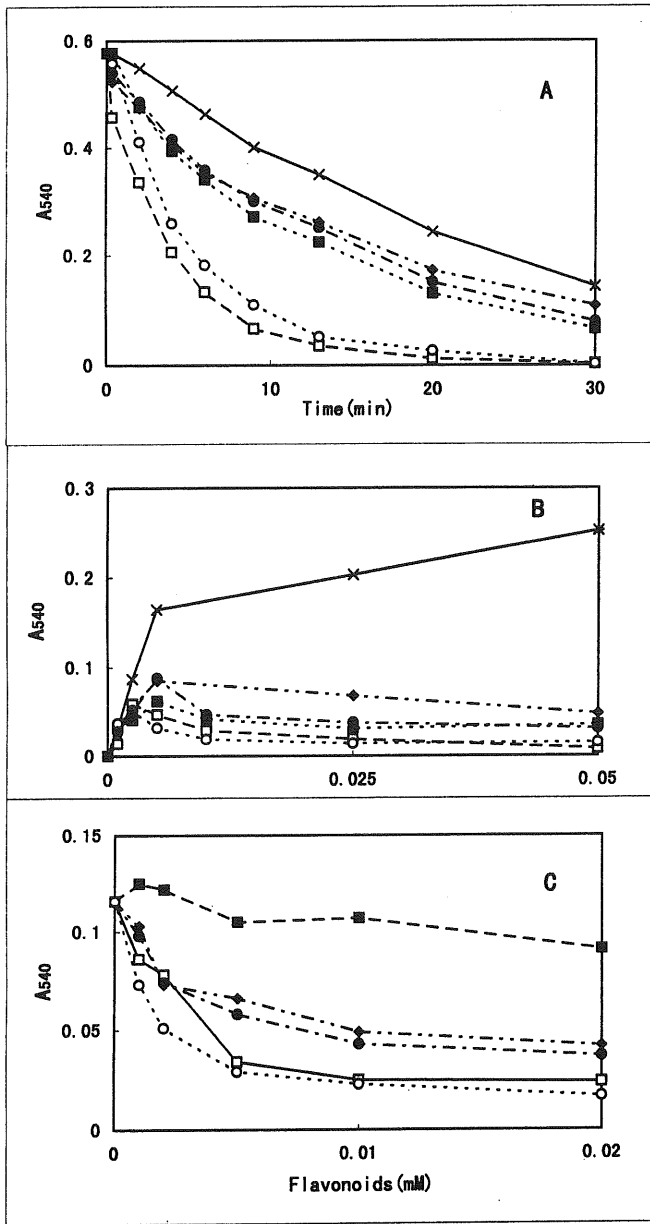
ラット肝ミクロソームにアスコルビン酸/ $\text{Fe}^{3+}$  を作用させて生じる過酸化脂質はTBARS (チオバルビツール酸に反応して発色する物質) として定量した<sup>2)</sup>。ミクロソームはラット肝ホモジェネートの  $8000 \times g$  上清を  $100,000 \times g$  で遠心して得られた沈澱部分を  $0.15\text{M}$  KCl に懸濁して用いた<sup>3)</sup>。

### 鉄の自動酸化に対する効果

$\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$  の反応に対する抗酸化物質の効果は  $\text{pH} 7.1$  のカコジル酸, またはトリス緩衝液中で  $\text{Fe}^{2+}$  をバソフェナンスロリン二スルホン酸を用いて経時的に定量する ( $540\text{nm}$  の吸収) ことにより測定した。

### 鉄還元力の測定

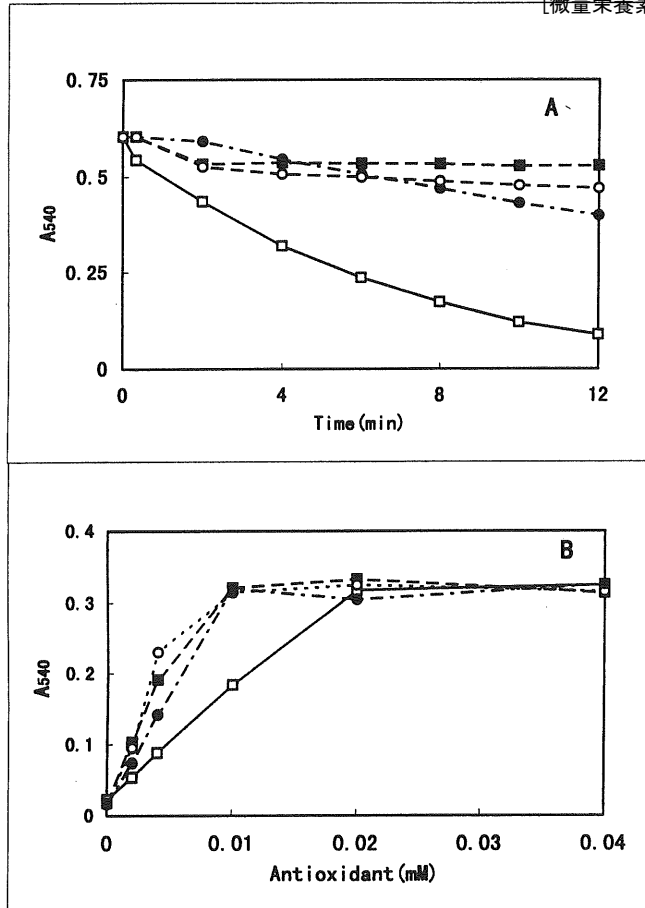
ポリフェノール類と  $\text{FeCl}_3$  を混和し,  $\text{Fe}^{3+}$  の還元によって生じた  $\text{Fe}^{2+}$  をバソフェナンスロリン二スルホン酸との結合による発色を用いて中性付近の  $\text{pH}$  で定量した。



**Fig.1** Interaction of flavonoids with iron. A. Effects on Fe<sup>2+</sup> autooxidation. Reaction mixture of 2 ml containing 10 mM Tris-HCl buffer (pH7.0), 0.05 mM FeSO<sub>4</sub> and flavonoids were incubated at 37°C. Aliquots of 0.2 ml were pipetted at appropriate intervals and mixed with 0.1 ml of 1 mM bathophenanthroline disulfonate. Absorbance at 540 nm was read. □, 0.01 mM baicalin; ■, 0.01 mM baicalin; ○, 0.01 mM quercetin; ●, 0.01 mM quercetin; ◆, 0.01 mM rutin; ×, no addition. B. Reduction of Fe<sup>3+</sup> by flavonoids. Reaction mixture of 0.4 ml contained 10 mM Tris-HCl buffer (pH7.0), 0.02 mM FeCl<sub>3</sub>, 0.5 mM bathophenanthroline disulfonate and various concentrations of flavonoids. After incubation for 30 min at 37°C, samples of 0.3 ml were transferred to microplate and measured absorbance at 540 nm by platereader. □, baicalin; ■, baicalin; ○, quercetin; ●, quercetin; ◆, rutin; ×, ascorbate. C. Inhibitory effects of flavonoids on ascorbate-mediated reduction of Fe<sup>3+</sup>. Experimental conditions were similar to those in B except that 0.5 mM ascorbate was included. □, 0.01 mM baicalin; ■, 0.01 mM baicalin; ○, 0.01 mM quercetin; ●, 0.01 mM quercetin; ◆, 0.01 mM rutin.

### 結 果

抗酸化剤であるポリフェノール化合物の代表としてフラボノイドと非フラボノイドと鉄イオンとの相互作用を解析した。フラボノイドはFe(II)の自動酸化を大きく促進し (Fig. 1A)。フラボノイド自身の還元力は中性では極めて弱かった (Fig. 1B)。さらにフラボノイドはアスコルビン酸による鉄の還元を阻止する作用を示した (Fig. 1C)。非フラボノイド系ポリフェノール化合物のクロロゲン酸および水溶性ビタミンEのトロロックスはFe(II)の自動酸化を完全に抑制し (Fig. 2A), それ自身は強力な鉄

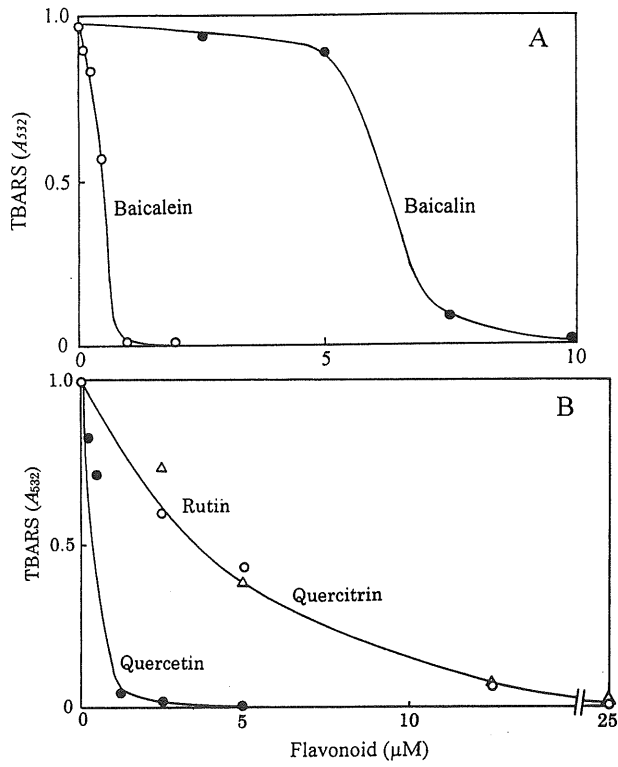


**Fig. 2** Interaction of polyphenolics and trolox with iron. A. Protection by polyphenolics of Fe<sup>2+</sup> autooxidation. Reaction conditions were similar to those described in the legend to Fig. 1A except that cacodylate buffer was substituted for Tris-HCl (pH7.0). □, no addition; ■, 0.1 mM protocatechuic acid; ○, 0.1 mM chlorogenic acid; ●, 0.1 mM trolox. B. Reduction of Fe<sup>3+</sup> by polyphenolics and trolox. Reaction mixture of 0.4 ml contained 10 mM bistris-HCl (pH7.0), 0.02 mM FeCl<sub>3</sub>, 0.5 mM bathophenanthroline disulfonate and various concentrations of antioxidants, and the reaction was carried out as described in the legend to Fig. 1B. □, ascorbic acid; ■, protocatechuic acid; ○, chlorogenic acid; ●, trolox.

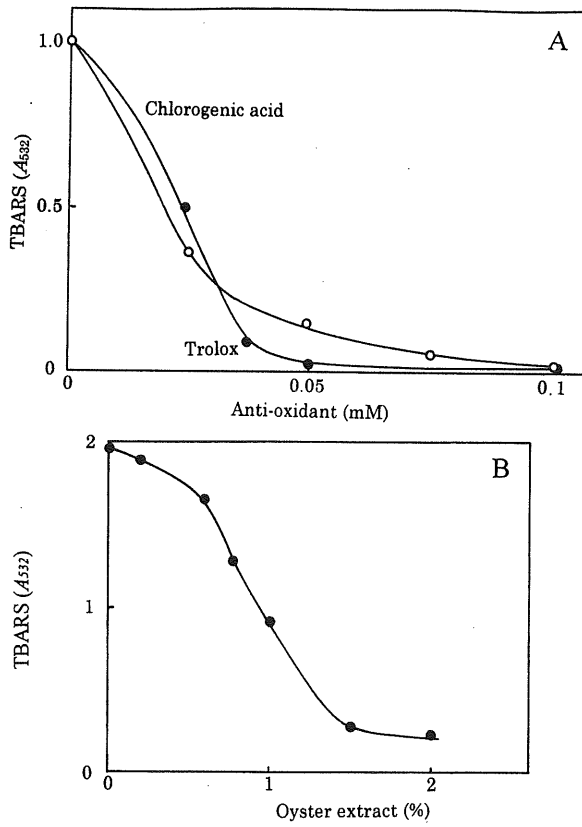
還元力を示した (Fig. 2B)。

フラボノイド (Fig. 3), 非フラボノイド (Fig. 4) 化合物ともミクロゾームにおける脂質過酸化反応を強力に抑制した。フラボノイドでは糖を結合していないバイカレイン (小柴胡湯中の黄芩の主成分) とケルセチン (ソバの成分) が最も強い過酸化脂質生成阻止効果を示した。結合した糖をもつバイカリン, ケルシトリン, ルチンも過酸化脂質生成を阻止するが, 10倍の濃度を必要とした。

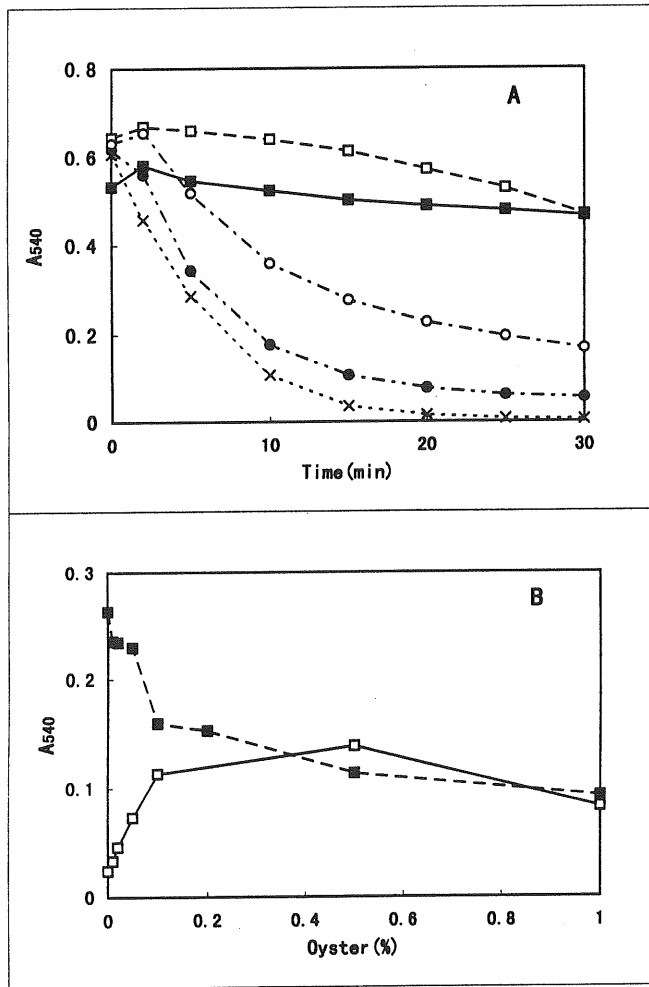
カキ肉エキス (シェフスター) は脂質過酸化反応の阻止効果と鉄の自動酸化を示した (Fig. 5A)。同時にアスコルビン酸による鉄還元を阻止する効果も示した (Fig. 5B)。



**Fig. 3** Effects of flavonoids on the iron-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes. Lipid peroxidation was expressed as the production of thiobarbituric acid-reactive substances, which was induced by 10 μM FeCl<sub>3</sub> and 0.5 mM ascorbic acid. A. ○, baicalein; ●, baicalin. B. ●, quercetin; ○, rutin; △, quercitrin.



**Fig. 4** Effect of chlorogenic acid, trolox and oyster extract on microsomal lipid peroxidation. Experimental conditions were similar to those described in the legend to Fig. 3. A. ○, Chlorogenic acid; ●, trolox. B. ●, oyster extract.



**Fig. 5** Interaction of oyster extract and amino acids with iron. A. Effect of oyster extract and amino acids on autooxidation of Fe<sup>2+</sup>. Experimental conditions were similar to those described in the legend to Fig. 1A. ■, 0.5% oyster extract; □, 1 mM cysteine; ○, 1 mM tryptophan; ●, 0.9 mM tyrosine. B. Effect of oyster extract on Fe<sup>3+</sup> in the presence (■) and absence (□) of 0.5 mM ascorbate. Experimental conditions were similar to those described in the legend to Fig. 1B.

### 考 察

抗酸化物質はそれ自身による活性酸素の“scavenge”する作用と、遷移金属、とくに鉄イオンを結合することにより2価鉄による酸素の還元を引き金とする活性酸素、さらにヒドロキシルラジカルの生成(Fenton 反応)を抑制することにあると考えられる<sup>4,5)</sup>。

脂質過酸化阻止効果を持つポリフェノールはいずれも強い鉄結合力を示すが、今回の結果から非フラボノイド系ポリフェノールはFe<sup>2+</sup>に強い親和性を持つ一方、フラボノイドはFe<sup>3+</sup>により強い親和性

を持つことが示された。フラボノイド化合物の鉄の酸化促進力とアスコルビン酸による鉄還元阻止効果に大きな差があり、とくに抗アスコルビン酸効果は脂質過酸化効果とよい相関を示した。

カキ肉エキスに含まれる抗酸化物質はフラボノイド系および非フラボノイドの両方の性質を持つ2種類以上の物質であると推測される。エキス中にはアミノ酸が含まれており、アミノ酸のうちシステインは強い鉄酸化阻止効果を持つが、カキ肉エキス中にはSH基は検出されなかった。トリプトファン、チロシンも含め、これらのアミノ酸は脂質過酸化阻止効果を示さなかった。またカキに多く含まれるタウリン、ヒポタウリンも全く抗酸化力を持たなかった。亜鉛も効果がなかった。

以上の結果よりカキ肉エキス中には植物由来のポリフェノール、フラボノイドによく似た物質が含まれるものと推定される。

## 文 献

- 1) Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1990) *Methods Enzymol.* 186 : 1-85
- 2) Draper H. H. and M. Hadley (1990) *Methods. Enzymol.* 186 : 421-431
- 3) Quinlan G. J., B. Halliwell, C. P. Moorhouse, J. M. C. Gutteridge (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 962 : 196-200
- 4) Ratty, A. K. and N. P. Das (1988) *Biochem. Med. Metabolic Biol.* 39 : 69-79
- 5) Morel, I., G. Lescoast, P. Cillard and J. Cillard (1994) *Methods Enzymol.* 234 : 437-443