

PEAT MOSH 中の腐植物質の抗酸化活性について (2)

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*)

Studies of the Antioxidative Activities of Humic Substances in Peat (2)

Yoko TACHIBANA, Sayo HORIBE and Riichi TAWA

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

Summary

Humic substances (HS) have physical, chemical and biological activities. One of the main elements of HS is humic acid (HA) which is constituted of the mixture of heterogeneous large molecule electrolytes. In order to reuse HA effectively, the antioxidative activities of partially decomposed HAs were evaluated since HA had reported to show some antioxidative activities. Native HA (HA-a) from peat was treated with high temperature (132°C) and high pressure (190 kPa) for 20 min (HA-b), 60 min (HA-c) and 120 min (HA-d). The peak top time of HA-a-d by high-performance size exclusion chromatography were 15.4, 15.8, 16.0 and 16.0 min, respectively. All of HA-b-d showed the antioxidative activities, such as scavenging activities for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and inhibitory effect on 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride-induced hemolysis of rabbit erythrocytes *in vitro* as much as HA-a. HA-a and HA-c were tested on the inhibitory effect of the damages by UVA irradiation (100 mJ/cm²) using human skin fibroblast cells. Both of them showed the inhibitory effect with significant differences.

腐植物質には物理的, 化学的および生物学的に多様な作用が認められており^{1,2)}, 成分のフミン酸 (HA) およびフルボ酸 (FA) はいずれも高分子電解質の不均一な混合物である^{3,4)}。PEAT MOSH から調製した HA および FA の抗酸化活性について報告したが⁵⁾, 腐植物質の医療分野における有効利用を考えると, HA や FA の低分子化と活性の強さとの関係についての検討が必要になってくる。今回, HA の抗酸化活性と部分分解による低分子化との関連を調べるために, HA を加熱・加圧処理により部分分解した分解物について (1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能, (2) ウサギ赤血球溶血阻止能および (3) ヒト培養細胞に対する紫外線障害抑制能の測定により抗酸化活性を比較した。

実験方法

1. 試料調製法

北海道産 PEAT MOSH から国際腐植物質学会 (IHSS) 法に準じて調製を行い HA を得た^{6,7)}。無処理の HA (HA-a) および次の条件で分解した物を試料とした。HA を 50 mM リン酸緩衝液 (PB) pH7.0 に溶解し (0.5 mg/mL), オー

トクレーブで① 132°C, 190 kPa, 20 分間 (HA-b) ② 132°C, 190 kPa, 60 分間 (HA-c) ③ 132°C, 190 kPa, 120 分間 (HA-d) 処理した。

2. 総ポリフェノールの定量

フォルイン-デニス法⁸⁾に準じ, 総ポリフェノールの定量を gallic acid (GA) を標準物質として行った。試料 100 μL, フェノール試薬 (1 N) 20 μL および 0.2 w/v% Na₂CO₃/0.1 M NaOH 100 μL をよく攪拌し, 室温で 1 時間放置後 700 nm における吸光度を測定した。

3. 高速排除クロマトグラフィー (HPSEC)

分子量の分布を以下の条件で HPSEC により測定した。カラム: Shodex SB-803 HQ (8.0 × 300 mm), 溶出液: 50 mM PB pH 7.0, 流速: 0.5 mL/min, 検出: 260 nm (Shimadzu SPD-6A)。分子量標準物質として polyethylene glycol (PEG) 20,000 (平均分子量 20,000), PEG 4,000 (平均分子量 3,000), PEG 400 (平均分子量 400), GA (分子量 188.13) を用いた。

*所在地: 呉市広古新開 5-1-1 (〒737-0112)

4. DPPH ラジカル消去法⁹⁾

200 mM 2-morpholinoethanesulphonic acid (MES) 緩衝液 (pH 6.0) 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。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 ascorbic acid (AA) を用いた。

5. 赤血球溶血阻止能の測定

赤血球溶血阻止試験は, ウサギ赤血球を用いて以下のように行った¹⁰⁾。ウサギ保存血 (日本バイオテスト) にリン酸緩衝食塩水 (PBS) を加え遠心分離して赤血球を集め, 4 倍量の PBS に懸濁して溶血試験に用いた。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 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (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。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。

6. 紫外線障害抑制能

ヒト皮膚線維芽細胞 (Cell Research Corp) (5×10^3 cells/well) を 96 ウェルのプレートに播種し, DMEM 培養液 (10% FBS, 1×10^5 U/mL penicillin G および 0.1 g/mL streptomycin を含む) で 24 時間前培養した後 UV (365 nm) 照射 (100 mJ/cm^2) した。試料添加 DMEM 培養液でさらに 24 時間培養した後 WST-1 (CCK-8, 同仁化学) を添加し, 4 時間後 450 nm における吸光度を測定した (Molecular Device Corp., Spectra Max 190)。

結果と考察

北海道産ピートモスから調製した HA を試料調製法で述べたようにオートクレーブで加熱・加圧処理した後, HPSEC により分解物の分子量の分布パターンを比較した (Fig. 1)。無処理の HA-a のピークトップの保持時間は 15.4 分で, 処理時間を 20 分 (HA-b), 60 分 (HA-c) および 120 分 (HA-d) と延ばすに従ってピークトップの保持時間は 15.8 分, 16.0 分および 16.0 分となった。このことから処理時間の延長により低分子化したものの割合が増加し, 60 分と 120 分ではほぼ同程度であることが分かった。それぞれの総ポリフェノール含量の値を比較したところ, HA-c が若干多くなった (Table 1)。

DPPH フリーラジカル消去能は, 125 μ g/mL (25 μ g/assay) において HA-b, c, d ではほぼ同等の 72~74% を示したのに対し, HA-a は約 65% で分解物よりやや低い活性であった (Fig. 2)。

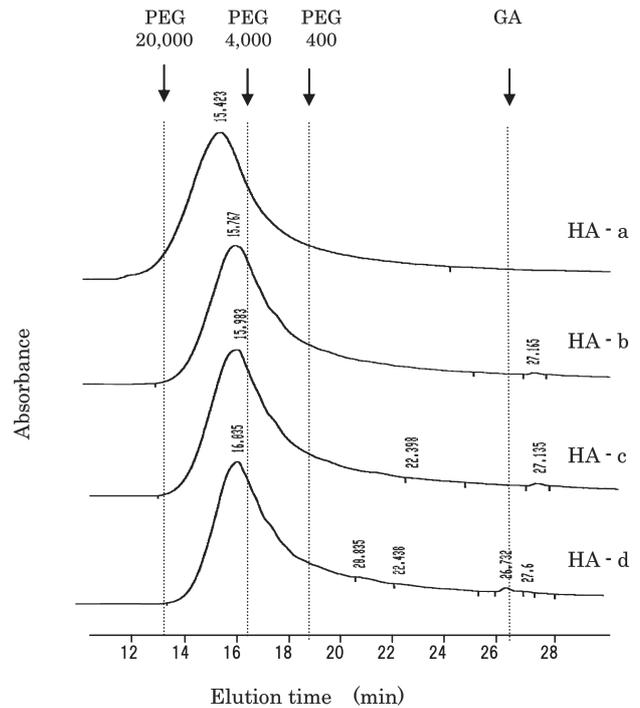


Fig. 1 High-performance size exclusion chromatography (HPSEC) of humic acid (HA-a) and degradation products (HA-b-d). HPSEC was performed as follows: column, Shodex SB-803 HQ (8.0 \times 300 mm); eluent buffer, 50 mM phosphate buffer (PB) pH 7.0; flow rate, 0.5 mL/min.; monitoring wavelength, 260 nm; standard, polyethylene glycol (PEG) 20,000, PEG 4,000, PEG 400 and gallic acid (GA).

Table 1 Total polyphenol contents of humic acid (HA-a) and degradation products (HA-b-d).

Compounds	Total polyphenols (%)
HA-a	14.1 \pm 0.3
HA-b	14.3 \pm 0.8
HA-c	14.8 \pm 0.2
HA-d	14.2 \pm 0.3

Values are means \pm S. E. (n=2-4).

次に, 赤血球膜に対する抗酸化能を評価するために, ウサギ赤血球に対する溶血阻止能を比較した。その結果, HA-a および部分分解物の HA-b, c, d とともに 33 μ g/mL (100 μ g/assay) においていずれも約 90% であり, ほとんど差がなかった (Fig. 3)。

紫外線 (UV) による障害は波長によって異なり, UVB (280~320 nm) は UVA (320~400 nm) より生物に対する影響が強いが, 波長が長い UVA の方が皮膚の奥深くまで到達し, 生体内の様々な分子に吸収されて, その結果生じる活性酸素が細胞に酸化的損傷を与える。HA-a および部分分解物の UV による障害の抑制能を比較するために, ヒト培養皮膚線維芽細胞を用い UVA (365 nm) 照射後の生存細胞の測定を行った。HA-c と HA-d は HPSEC での分子量分布がほとんど同じであり, DPPH ラジカル消去能およびウサギ赤血球に対する溶血阻止能も同程度なので, ここでは HA-a と HA-c の比較を行った。まず, これらの

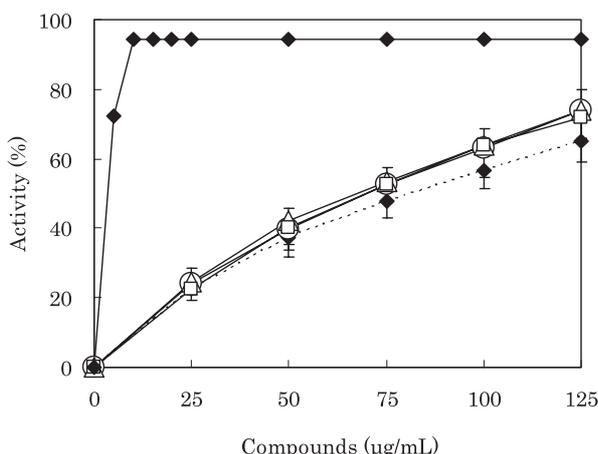


Fig. 2 Scavenging activities for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical of humic acid (HA-a) and degradation products (HA-b-d). A solution of 400 μM DPPH (50 μL) was added to the mixture of 200 mM MES buffer (50 μL), 20 % ethanol (50 μL) and 0.01 M NaOH/80 % ethanol (50 μL) containing varying amount of the test compound. The absorbance of the mixture was measured at 520 nm after 20 min. ---◆---, HA-a; ○, HA-b; △, HA-c; □, HA-d; —◆—, ascorbic acid. Data are expressed as mean \pm S. E. (n = 2-4).

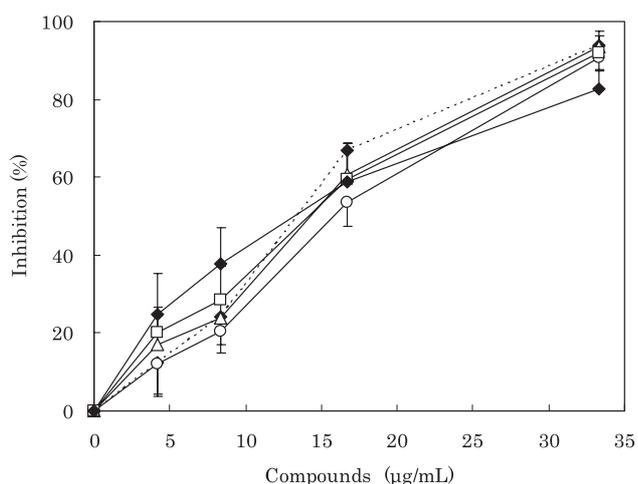


Fig. 3 Inhibitory effect of humic acid (HA-a) and degradation products (HA-b-d) on 2,2'-azobis (2-amidino propane) dihydrochloride (AAPH) -induced hemolysis of rabbit erythrocytes *in vitro*. A mixture of rabbit erythrocyte suspension (0.5 mL), phosphate-buffered saline (PBS) (0.5 mL) containing varying amount of the test compound and 200 mM AAPH (0.5 mL) was incubated at 37°C for 3 h. An aliquot (0.5 mL) of mixture was diluted with PBS (4 mL) and centrifuged at 1,500 g for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. ---◆---, HA-a; ○, HA-b; △, HA-c; □, HA-d; —◆—, ascorbic acid. Data are expressed as mean \pm S. E. (n = 3).

細胞毒性を調べるために培養液に試料を添加し24時間後の生細胞数を測定したところ50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度までは両者ともに細胞毒性は認められなかった (Fig. 4a)。次に、100 mJ/cm^2 のUVAを照射し、試料添加DMEMで培養後生存細胞の測定を行った。試料のかわりにPBSを添加したcontrolでは、生存細胞は約60%に減少したが、試料の添加により両者とも有意な生存細胞の増加を示した

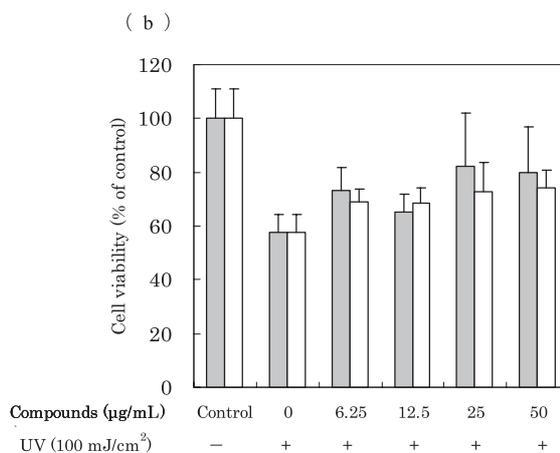
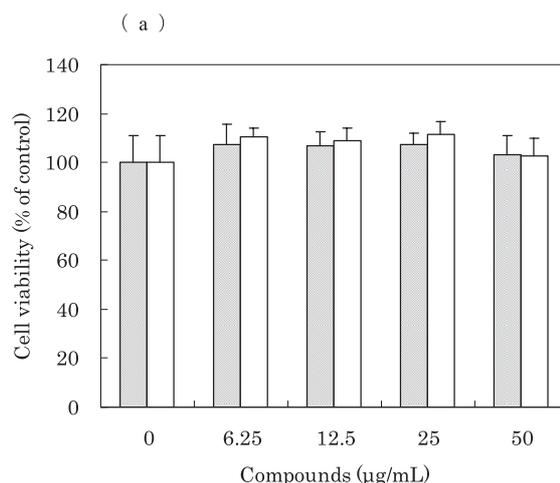


Fig. 4 Effect of humic acid (HA-a) and degradation products of humic acid (HA-c) on the cell viability. (a) The human skin fibroblast cells (5,000 cells/well) were cultured for 24 h. After addition of the compounds, they were cultured for another 24 h. The cytotoxicity was measured using CCK-8 Kit (WST-1) by reading the absorbance of 450 nm. (b) Inhibitory effect on the damage by UVA irradiation. The human skin fibroblast cells (5,000 cells/well) were cultured with DMEM for 24 h. and irradiated with UVA (100 mJ/cm^2). The cells were further cultured with the indicated concentration of the compounds for 24 h. After incubation, WST-1 was added and the cells were incubated at 37°C for 4 h. The absorbance of 450 nm was read on a micro plate reader (Molecular Device Corp., Spectra Max 190). ■, HA-a; □, HA-c. Data are expressed as mean \pm S. D. (n = 5-10). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significant difference from the control.

(Fig. 4b)。

腐植物質の活性と分子量の関係については、植物細胞に対してのオーキシソクシ活性が、低分子量画分の方が高分子量画分より強いという報告がある¹¹⁾。今回、HAを部分分解により低分子化したものについて、DPPHラジカル消去能、ウサギ赤血球溶血阻断能およびヒト培養細胞に対する紫外線障害抑制能などの抗酸化活性を検討したが、HAの部分分解物はHAと同等の活性を保持していることが分かった。

参考文献

- 1) 山田パリーダ, 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 FD, 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) Schulten HM, Schnitzer M (1991) A chemical structure for humic substances. *Naturwissenschaften* 78: 311-312.
- 4) Leenheer JA, Wershaw RL, Reddy MM (1995) Strong-acid, carboxyl-group structures in fulvic acid from the Suwannee river, Georgia. 2 Major structures. *Environ Sci Technol* 29: 399-405.
- 5) Tachibana Y, Horibe S, Tawa R (2006) Studies of the antioxidative activities of humic substances in peat (I). *Trace Nutrients Res* 23: 104-108.
- 6) Tachibana Y, Tawa R (2005) Preparation and characterization of humic substances in peat. *Trace Nutrients Res* 22: 111-115.
- 7) Swift RS (1996) Organic matter characterization. in *Method of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*, ed. by Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Johnson CT, Summer ME, Soil Sci Soc Am, Madison: pp. 1018-1020.
- 8) Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144-158.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Muscolo A, Sidari M, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S (2007) The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell culture. *J Chem Ecol* 33: 115-129.