ノ ー ト

内標準を用いるガスクロマトグラフィー/質量分析法による 尿中チミングリコールの定量に基づくカテキン及びビルチンの 活性酸素消去能の評価

千室 智之^{*,***}, 杉山 民二^{®*}, 船引 龍平^{**}

Determination of thymine glycol in rat urine by isotope dilution GC/MS for evaluating the antioxidative efficacy of flavonoids

Tomoyuki CHIMURO^{*,***}, Tamizi SUGIYAMA^{*} and Ryuhei FUNABIKI^{**}

^{*}Department of Agricultural Chemistry, Meiji University, 1-1-1, Higashimita, Tama-ku, Kawasaki, Kanagawa 214-8571

^{**}Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8, Saiwai-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183-8509

^{***}Present address; Isehara Research Laboratories, Kanto Chemical Co., Inc., 21, Isehara-shi, Kanagawa 259-1146

(Received 17 January 2000, Accepted 17 February 2000)

Mass spectrometry using deuterium-labeled standard was applied to determine thymine glycol in the urine of rats fed with catechin and rutin in order to evaluate their antioxidative efficacy. The rats were freely fed a 20% casein diet containing 1% catechin and/or 1% rutin and water for 56 days. The urine samples were collected on the last 2 days of feeding. Thymine glycol-*d*₅ was added to one ml aliquots of the urine samples, and then recovered with thymine glycol in the samples by affinity chromatography, solid-phase extraction and HPLC using an ODS column. The recovery of thymine glycol was 40-56% through the purification steps. The thymine glycol fractions recovered were converted to tetra-TMS derivatives and then applied to GC/MS analysis. Thymine glycol in urine samples of rats fed with catechin decreased to 68% levels ($P < 0.05$) of those of no-administered control. However, the antioxidative efficacy of rutin was not observed by this method. These results suggest that catechin has the ability to prevent oxidative DNA damage on the basis of thymine glycol levels in rat urine samples.

Keywords : thymine glycol; urine; GC/MS; isotope dilution; catechin.

1 緒 言

DNA レベルでの酸化ストレスによる機能障害とその防御が注目を集めている。なかでも、DNA 塩基がヒドロキシルラジカル (・OH) など活性酸素の攻撃を受けて生じる酸化損傷物質は、酸化ストレスのバイオマーカーとして重要視されている。特に、DNA 修復酵素の作用を受けて尿

中に排せつされるチミングリコール (Tg), 8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua), 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) は、ヒトにおいても DNA レベルにおける酸化的損傷に由来し、老化や発がんのマーカーとして有用性が高い^{1)~4)}。

食品の機能として健康維持や疾患の予防にかかわる機能が注目されている。特に生体内で活性酸素の消去能力を持った食品抗酸化物質の利用には、生活習慣病の予防において大きな可能性が秘められている⁵⁾⁶⁾。これら食品抗酸化物質の *in vivo* 系での機能評価法の開発が期待されている。

著者らは既に、ヒト及びラット尿中の Tg を回収・精製

* 明治大学農学部: 214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

** 東京農工大学農学部: 183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8

*** 現在: 関東化学(株)伊勢原研究所: 259-1146 神奈川県伊勢原市鈴川 21

し、重水素標識チミングリコール (Tg- d_3) を内標準物質 (IS) とする質量分析法により、尿中 Tg の迅速な定量法を報告した⁷⁾。そこで著者らは、茶カテキン類を飼料とともに与えたラットの尿中に排せつされる Tg 量に基づいて、*in vivo*系におけるこれら食物成分の活性酸素消去能という機能評価法について検討した。

2 実 験

2.1 ラット尿の採取

体重 40～50 g の 3 週齢の雄性ラット Crj: CD (SD) (日本チャールズリバー製) を温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、明暗 12 時間に設定した飼育室で 3 日間予備飼育した。飼料として CE-2 (クレア製) を与えた後、試験に用いた。1 群を 7 匹として 3 群に分け、それぞれ無添加、1% ルチン、1% カテキンを含んだ 20% カゼイン飼料を、水道水とともに自由摂取させた。5 連ゲージで 7 週齢まで飼育した後、代謝ゲージに移した。生後 55～56 日 (8 週齢) の 48 時間分のラット尿を全量採取した。ラットの体重を測定した。

2.2 尿中からの Tg の回収・精製⁷⁾

Fig. 1 のスキームに従って、尿中から Tg を回収・精製した。採取した尿 1 ml に重水素標識 Tg- d_3 を IS として 96.6 ng 添加した。更に 99% メタノールを 2 ml 加え、 -20°C で 1 晩静置した。沈殿物を遠心分離 ($10000\text{ g} \times 15$ 分) した後、上澄みを濃縮して乾固させた。乾固物を 1 ml の 0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.6) に溶解し、アフィニティークロマトグラフィー (aff-gel 601, Bio-Rad 製, USA) に供した。0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.6) で洗浄した後、0.5 M 酢酸で溶出した画分を乾固させた。それを 1 ml の精製水で溶解し、Sep-Pak C₁₈ カートリッジ (Waters 製, USA) で非極性画分を除去した。その水溶出液を島津 LC-6A (ポンプ) と SPD-6A (UV-220 nm 検出器) を付置した高速液体クロマトグラフィーに供した。カラムは島津製 Shim-pack CLC-ODS ($150 \times 6\text{ mm}$ i.d.) を使用した。溶媒に蒸留水を用いて 1.0 ml/min の流量で展開し、Tg- d_3 とともに尿中 Tg を合成標品の保持時間に基づいて IS 相当画分として回収した。

2.3 GC/MS 分析⁷⁾

回収した IS 相当画分はトリメチルシリル誘導体 (Tg-4TMS) として、GC/MS 分析に供した。ガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 製 5890 シリーズ II) を連結した質量分析計 JMS-SX102A (日本電子製) を使用した。本装置の試料導入部と連結部の温度は 250°C に、イオン源温度は 250°C に設定した。分離にはキャピラリーカラム (URBAN HP-1, $30\text{ m} \times 0.32\text{ mm}$ i.d., 液相 $0.25\text{ }\mu\text{m}$, 親

Fig. 1 Procedures for the recovery of thymine glycol from rat urines

和化成工業製) を用いた。キャリアーガスは He で 1.1～1.3 ml/min, カラムヘッド圧は 50 kPa に設定した。試料導入はスプリットレスで行った。カラムオープン初期温度が 100°C で 1 分間維持し、その後 $30^\circ\text{C}/\text{min}$ で 280°C まで昇温した。質量スペクトルは、イオン化電圧 70 eV, 加速電圧 10 kV で測定した。

2.4 尿中クレアチニンの測定

自動分析用クレアチニン PAP「BMY」(ペーリンガー・マンハイム製) を用いて尿中のクレアチニンを測定した。日立 U-220A 自記分光光度計を用い、測定波長 405 nm, 測定温度 37°C で測定した。

2.5 重水素標識化合物の調製

使用した重水素標識化合物は既報⁷⁾に示した合成法により調製した。標識率は 99.11% であった。

2.6 添加回収試験

8.06 ng/ml の Tg- d_3 を添加したヒト尿に、43 及び 86 ng/ml の Tg- d_0 をそれぞれ加えたものを分析試料とした。2.2 の手順に従って、精製ステップごとに 1 ml ずつを乾固させた後、トリメチルシリル化して GC/選択イオン検出 (SIM) を行い、2.3 の方法で Tg- d_0 /Tg- d_3 比を求め、回収率を算出した。

Fig. 2 SIM chromatograms of thymine glycol fractions recovered from rat urines

a: control; b: catechin; c: rutin

GC/MS conditions: EI^+ , 70 eV, 250°C; column, HR-1, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d. (df: 0.25 μm); temp. 100 ~ 280°C, rate 30°C/min; flow rate, 1.1 ~ 1.3 ml/min

Table 1 Amount of thymine glycol and creatinin in rat urines

Group	Amount	
	Thymine glycol/ nmol kg^{-1} body weight per day	Creatinine/ mmol kg^{-1} body weight per day
Control	3.08 ± 0.28	0.19 ± 0.01
Catechin	$1.70 \pm 0.15^\dagger$	0.16 ± 0.02
Rutin	2.18 ± 0.35	0.15 ± 0.01

Each value for rat groups is mean $\pm$ SEM of 7 animals. $^\dagger P < 0.05$ vs. control group

3 結果と考察

尿中の成分を再現性よく分析するためには、きょう雑物質を除去するクリーンアップが重要である。尿 1 ml に Tg- d_8 (96.6 ng) を IS として添加した後に、きょう雑成分としてのタンパク質を除去した。その際、Tg の安定性を考慮してトリクロロ酢酸などの強酸を避け、メタノールでタンパク質を変性させた後、遠心にて除タンパクした。次に Tg の *cis*-ジオール部分構造に着目して、ボロネイトアフィニティークロマトグラフィーにて *cis*-ジオール構造を持った成分を選択的に分離・回収した。更に疎水性成分の除去を目的として、固相抽出カートリッジで処理した後に HPLC にて精製した。添加回収試験により各精製ステップでの Tg の回収率を求めた結果、最終的な回収率は 40 ~ 54% であった。除タンパクとアフィニティークロマトグラフィーまでの間に 30 ~ 49% の損失が起っていた。固相抽出、逆相 HPLC の精製ステップでは、ほぼ定量的に回収されていた。

HPLC により精製・回収した IS 相当画分を、GC/MS 分析のために Tg-4TMS 化した。GC/MS により IS とともに内生 Tg が保持時間 6.7 分で溶出された。そのピークで MS を測定した結果、分子イオンである m/z 448 (尿中 Tg) 及び m/z 451 (IS: Tg- d_8) と代表的なフラグメントイオン

の存在が確認できた。それぞれの分子イオンである m/z 448 と 451 イオンを用いて GC/SIM を行った。Fig. 2 に SIM クロマトグラムを示した。ピーク面積比を別に作成した検量線で補正し、尿中 Tg 量を算出した。個々の尿試料ごとに 3 回の測定を行ったときの定量精度は、相対標準偏差 (RSD) で 2.6% であった。Table 1 に 1 日の体重当たりに換算した Tg 排せつ量を示した。コントロール群に対してカテキン摂取群では有意差 ($P < 0.05$) が認められたが、ルチン摂取群では有意差が認められなかった。Tg レベルから、カテキンの抗酸化能力が再確認された。

評価の信頼性をより高める方策として、タンパク質代謝研究で利用されている尿中クレアチニン量の利用を試みた。尿中クレアチニン量を基準とすることで、ラット尿中の成分濃度を補正し、茶カテキン類の活性酸素消去能がより明瞭に判定できるかどうかを検討した⁸⁾。尿中のクレアチニン量は酵素発色法で測定した。尿中クレアチニン排せつ量を Table 1 に示した。

7 匹のラットを 1 群として尿中のクレアチニン濃度は、いずれの試験区においても 0.10 ~ 0.22 mmol/kg 体重であった。クレアチニン 1 mmol 当たりの Tg (nmol) 排せつ量を求めた。その結果を平均値 $\pm$ 標準誤差として Fig. 3 に示した。コントロール群 (16.94 ± 2.10 nmol/mmol クレアチニン) に対して、カテキン摂取群 (11.52 ± 1.46

Fig. 3 Effect of experiment diets on thymine glycol levels in rat urines

Each value for rat groups (CD strain, 7 weeks of age, 247 g body weight, male) is the mean $\pm$ SEM of 7 animals. Tg: thymine glycol; Cre: creatinine

nmol/mmol クレアチニン) では Tg の排せつ量が約 68% に, ルチン摂取区 (14.38 ± 2.17 nmol/mmol クレアチニン) では約 85% に抑制されていた。カテキンについては, これまでの報告と同様に $\cdot\text{OH}$ など活性酸素の消去能力が, Tg 排せつ量を指標としても確認された (有意差 $P < 0.05$) が, ルチンは明確な効果が認められなかった。尿中クレアチニン量に基づく Tg 量を比較することでより有効性が明らかにできた。更に DNA 塩基の代謝物である尿酸などが, 尿中クレアチニンと同様の指標として利用できるかを検討している。

以上の結果から, 重水素標識体を内標準とする質量分析法は, 尿中 Tg をバイオマーカーとし, 食物成分の機能評価を行う方法として有効であることが確認できた。また, 激しい運動により活性酸素の産生が増加し, 生体内のタンパク質, 脂質, DNA などが損傷される可能性が指摘されており, 尿中の 8-OH-Gua や 8-OHdG 量の調査が行われ

ている⁹⁾¹⁰⁾。尿を分析試料とすることは, 試料採取による負担が少ない利点を有しており, 非常に有効であると考えられる。8-OHdG については, モノクローナル抗体を用いた ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法が開発され実用化されている¹¹⁾。Tg に関してはポリクローナル抗体を用いた ELISA 法の報告¹²⁾があるが, まだ実用化されていない。これまでの Tg の分析操作は煩雑であり, 8-OH-Gua や 8-OHdG と比較して簡便性に欠けるものであった。本研究は 1 ml の尿から Tg を高精度にかつ短時間に分析することを可能とし, 食品の機能評価や運動による生理機能の検討を行う際の有効な方法の一つであると考えられる。

文 献

- 1) S. Iida, H. Hayatsu: *Biochim. Biophys. Acta*, **240**, 370 (1971).
- 2) R. Cathcart, E. Schwieters, R. L. Saul, B. N. Ames: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 5633 (1984).
- 3) H. Kasai, S. Nishimura: *Nucl. Acid Res.*, **12**, 165 (1984).
- 4) D. S. Bergtold, E. Holwitt, M. G. Simic: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **338**, 383 (1990).
- 5) T. Hatamoto, R. Edamatsu, M. Hramatsu, A. Mori, Y. Fujita, T. Yamashita, T. Yoshida, T. Okada: *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2016 (1989).
- 6) Y. Hamasaki, S. Ogawa, S. Fukui: *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 195 (1988).
- 7) T. Mase, T. Sugiyama, R. Funabiki: *Anal. Sci.*, **15**, 899 (1999).
- 8) G. J. Quinlan, N. J. Lamb, R. Tilley, T. W. Evans, J. M. Gutteridge: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, **155**, 479 (1997).
- 9) H. M. Alessio: *Med. Sci. Sports Exerc.*, **25**, 218 (1993).
- 10) H. E. Poulsen, S. Loft, K. Vistisen: *J. Sports Sci.*, **14**, 343 (1996).
- 11) S. Toyokuni, T. Tanaka, Y. Hattori, Y. Nishiyama, A. Yoshida, K. Uchida, H. Hiai, H. Ochi, T. Osawa: *Lab. Invest.*, **76**, 365 (1997).
- 12) K. H. Smith, H. Z. Hill, G. J. Hill: *Radiat. Res.*, **130**, 160 (1992).