卵黄に含まれるビタミン B1 の酸化的安定性に関する研究

名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻・准教授　柴田　貴広

■　緒　言

ビタミン B1（チアミン）は卵黄などの食品中に豊富に含まれている水溶性ビタミンの一種である（図 1）。チアミンは、生体内において水酸基にリン酸が付加したチアミン一リン酸（TMP）、チアミンピロリン酸（TPP）、チアミン三リン酸（TTP）に変換された後、それぞれ特有の生理作用を示す。TPP はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体などの補酵素として反応を触媒するため、糖代謝や分岐鎖アミノ酸の代謝において重要な働きを示す。また、TTP は中枢神経や末梢神経の機能を正常に保つために重要な役割を果たしている。チアミン類は経口摂取されると、TMP、TPP、TTP がホスファターゼにより一度チアミンに変換されてから吸収され、生体内で再度リン酸化される。そして、体内で利用されたチアミンおよびその誘導体は尿中に排泄される。過剰量のチアミンはそのまま尿で排泄されるため、過剰摂取による障害は現在までに報告されていない。一方でチアミン不足においては多くの疾病が惹き起こされることが知られており、その代表的なものには脚気やウェルニッケ脳症がある。このように生体において必須な栄養素であるビタミン B1 は、酸化的な変性を受けやすいと考えられているが[1-3]、その酸化物や酸化の過程などに関する研究はあまりなされておらず、卵黄などの食品中におけるビタミン B1 の酸化的な動態は解明されていない。そこで本研究では、卵黄中に含まれるビタミン B1 の酸化的な安定性を明らかにすることを目的とした。特に、ビタミン B1 の酸化生成物の化学構造解析とその酸化過程を化学的に解析し、その全容を明らかにすることを目指して研究を行った。また、質量分析計を駆使した高感度検出・定量法を確立し、卵黄や卵黄食品におけるビタミン B1 の酸化生成物の解析を行うことにより、これらの食品の安全性・健全性評価におけるビタミン B1 酸化物の意義を明らかにすることを目的とした。

■　方　法

1. 試薬類

チアミン塩酸塩は、富士フイルム和光純薬(株)のものを使用した。有機溶媒については、すべて関東化学(株)より入手した。それ以外の試薬類については、特記のない限り、富士フイルム和光純薬(株)の特級もしくはそれと同等以上のものを用いた。

2. チアミン酸化反応物の調製と HPLC 分析

50mM リン酸緩衝液(pH7.4)中で、チアミンとローズベンガルをそれぞれ終濃度 1mM および 0.1mM となるように混合した後、室温で光照射を 24 時間行った。酸化反応液を超純水で 10 倍希釈した後、0.45μm のフィルターに通したものを分析に供した。高速液体クロマトグラフ(HPLC)は、日本分光(株)社のフォトダイオードアレイ検出器付き HPLC(EXTREMA)を用いた。カラムは、逆相系 Develosil C30-UG-5 カラム(野村化学)を用い、溶媒 A(0.1%ギ酸水溶液)および溶媒 B(メタノール)を移動相として用いた。グラジエントは、0 min、1% 溶媒 B ; 1 min、1% 溶媒 B ; 25 min、64% 溶媒 B の条件で行った。

3. 質量分析計によるチアミン酸化反応物の分析

質量分析は、Waters 社の超高速液体クロマトグラフ-タンデム四重極型質量分析計(ACQUITY UPLC Xevo TQD)を用いた。カラムは逆相系 Develosil C30-UG-3(野村化学)を用い、溶媒 A(0.1%ギ酸水溶液)および溶媒 B(メタノール)を移動相としたグラジエント溶離条件で分析を行った。グラジエントは、0 min、1% 溶媒 B ; 0.5 min、1% 溶媒 B ; 5.5 min、40% 溶媒 B ; 6.5 min、90% 溶媒 B の条件で行った。

4. NMR によるチアミン酸化生成物の化学構造解析

3 種類のチアミン酸化生成物について、HPLC により分取・精製した後、重水に溶解し、400 MHz NMR(Bruker 社 Avance)に供した。また、分取したサンプルに関しては、Applied Biosystems 社製 ESI-

TOF MS Mariner により精密質量を測定した。

5. 質量分析計によるチアミン酸化物の定量解析

化学構造の明らかになったチアミン酸化生成物(FAP)に関して、選択反応モニタリング(SRM)モードにおける MS/MS 測定の条件最適化を行い、定量方法を確立した。また、安定同位体標識物(FAP-d_3)を作製し、安定同位体希釈法による定量方法を確立した。

6. 卵黄中におけるチアミン酸化生成物の形成と定量的解析

市販の鶏卵より得た卵黄を 2g ずつ 2 つにわけ、一方は遮光条件、室温で 24 時間撹拌し、もう一方はコントロールとして、冷蔵庫にて 24 時間保存した。24 時間後、0.1N 塩酸溶液を 50ml 加え、30 分間還流した後、ろ過した。ろ液にアセトンを加え、-30℃で 1 時間インキュベーションした後、3600rpm で 15 分遠心分離した。その上清を遠心エバポレータで乾固後、超純水に再溶解し、不溶物を除去したものをサンプルとして質量分析に供した。

■ 結 果

1) ビタミン B1 の酸化物の解析

チアミンを光増感剤であるローズベンガル存在下で光照射し、24 時間インキュベーションした。このサンプルを HPLC 分析に供したところ、原料のチアミン以外に複数のピークが検出された。さらにこのサンプルを質量分析計により測定したところ、生成物のうちのひとつは、すでにチアミン酸化物として報告のあるチアミンジスルフィドであることが明らかとなった。こうして検出されたピークが、チアミンと一重項酸素との反応による生成物であるかを検討するために、光依存性の実験を行ったところ、光照射しなかった場合は形成が確認されなかった。また、ローズベンガルに由来する分解物ではないことを確認した。さらに、ローズベンガルとは異なる光増感剤であるメチレンブルーと、一重項酸素発生試薬であるエンドペルオキシド試薬を用いて実験を行った。その結果、メチレンブルーおよびエンドペルオキシド試薬において、ローズベンガルの場合と同様に、m/z 167、297、331 に相当する生成物が検出された (図 2)。

次に、これらの酸化生成物と予想されるもののうち、m/z 167 に相当する生成物の化学構造を明らかにするために、HPLC を用いて分取・精製し、質量分析および NMR による解析を行った。m/z 167 に相当する酸化生成物はプロダクトイオンスキャンの結果から m/z 122 のピリミジン環構造を有していることと、高分解能質量分析測定の結果から *N*-ホルミル化が起きていると予想し、^{1}H-NMR および ^{13}C-NMR の帰属を行ったところ、formylaminopyrimidine (FAP)であることが明らかとなった (図 3)。

2) ビタミン B1 酸化物の定量法の確立

チアミンの酸化生成物として見出した FAP に関して、質量分析計を用いた高感度検出定量法の確立を行った。特に、ULPC-ESI-MS/MS を用いた選択反応モニタリング(SRM)モードにおける定量方法を確立するため、標準品を用いて質量分析計の測定条件の最適化を行った。またより定量的な解析を可能とするため、FAP の安定同位体標識物を調製し、安定同位体希釈法による定量方法を確立した。さらに、生体サンプルや食品サンプルからの定量的解析ができるように、サンプルの前処理方法について検討を行い、最適な方法を決定した。

3) 卵黄中におけるビタミン B1 の酸化反応の解析

卵黄中に含まれるビタミン B1 酸化物について、質量分析計を用いた検出・定量を試みた。その結果、卵黄を室温、遮光条件下で 24 時間撹拌することにより、チアミンが減少する一方で、FAP は増加することが明らかとなった (図 4)。

■ 考 察

本研究において、ビタミン B1 の酸化生成物としてすでに報告のなされているチアミンジスルフィド以外に、FAP を新たに見出した。今回は光増感剤による一重項酸素産生系を用いているが、それ以外の酸化系においても、これらの酸化物が生成されるという予備的結果を得ている。このことから、チアミンは生体内においても酸化される可能性が示唆される。またその化学構造から、FAP はリン酸化されないと考えられるため、酸化的変性によりチアミンのビタミン B1 活性は失われるものと予想される。さらに、卵黄中のチアミンは酸化により減少し、逆に FAP が増加することを明らかにした。

このことは、卵黄中におけるチアミンの酸化に対する不安定性を示すものであると考えられる。さらに、このチアミン酸化生成物を指標として、卵黄および卵黄含有食品の酸化的劣化に対する指標となりうる可能性がある。今後、今回確立した定量方法を利用して様々な食品中にビタミン B1 酸化物を定量的に評価することが必要である。また、質量分析計によらない簡便な検出定量方法を確立することができれば、さらに応用面での展開も期待される。

■ 要 約

ビタミン B1(チアミン)は卵黄などの食品中に豊富に含まれている水溶性ビタミンの一種であり、酸化的な変性を受けやすいと考えられているが、その酸化物や酸化の過程などに関する研究はあまりなされておらず、卵黄などの食品中におけるビタミン B1 の酸化的な動態は解明されていない。そこで本研究では、卵黄中に含まれるビタミン B1 の酸化的な安定性を明らかにすることを目的とし、ビタミン B1 酸化生成物の化学構造解析とその酸化過程を化学的に解析した。また、質量分析計を駆使した高感度検出・定量法を確立し、卵黄におけるビタミン B1 の酸化生成物の解析を行った。光増感剤を用いてチアミンを酸化させたところ、複数の酸化物の生成が認められた。このうち、主要な酸化物のひとつとして、formylaminopyrimidine (FAP) を同定した。さらに質量分析による FAP の高感度検出定量法を確立した。この方法を利用して、卵黄中における FAP の定量を行ったところ、室温、遮光条件化で撹拌することにより酸化させた卵黄において顕著に FAP が増加することが明らかとなった。これらのことから、卵黄の酸化的劣化により、チアミンが酸化し FAP を生成しうることが明らかとなった。

■ 文 献

1) Lukienko, P.I., Mel'nichenko, N.G., Zverinskii, I.V., Zabrodskaya, S.V. (2000) Antioxidant Properties of thiamine. *Bull. Exp. Biol. Med.* 3, 1213-1217.
2) Natera, J., Massad, W. A., García, N. A.(2011)Vitamin B1 as a scavenger of reactive oxygen species photogenerated by vitamin B2. *Photochem. Photobiol*. 87, 317-323.
3) Stepuro, I.I., Oparin, A.Y., Stsiapura, V.I., Maskevich, S.A., Titov, V.Y. (2012) Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide. *Biochemistry*(*Mosc*)77, 41-55.

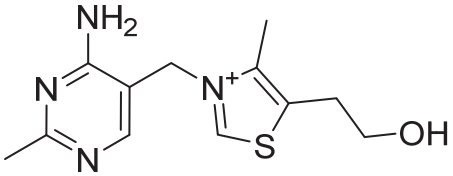

図 1 ビタミン B1 (チアミン) の化学構造

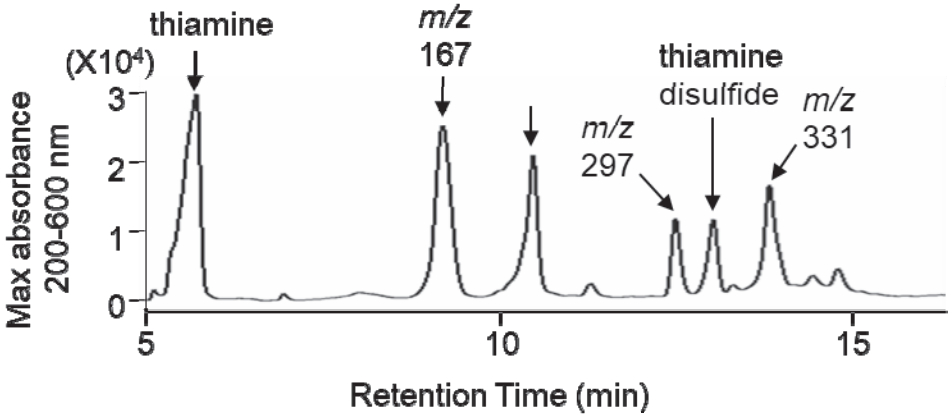

図２　ローズベンガルを用いて酸化させたチアミンの HPLC 分析結果

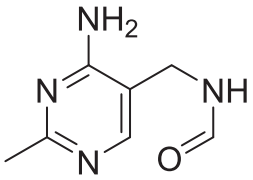

図３　formylaminopyrimidine（FAP）の化学構造

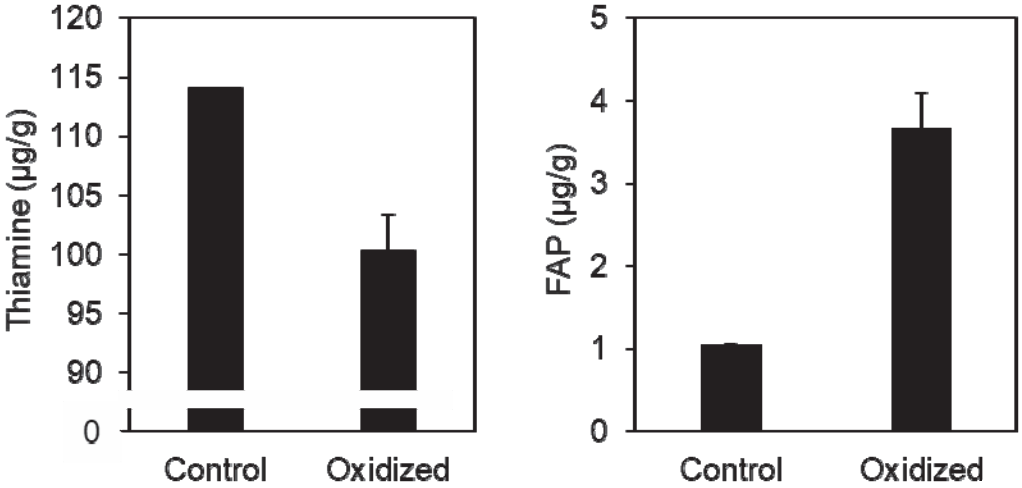

図４　卵黄中のチアミンおよび FAP 量の酸化による変動
左、酸化させた卵黄および未酸化の卵黄中に含まれるチアミン量（卵黄１g あたり）
右、酸化させた卵黄および未酸化の卵黄中に含まれる FAP 量（卵黄１g あたり）