

牛乳のフラビンの組成に関する研究

—牛乳における10-(2'-hydroxyethyl)flavinについて—

宇都宮大学農学部教授 菅野 長右門

Roughead & McCormick [1] は、牛乳に10–20%の10-(2'-hydroxyethyl)flavin (HEF) が存在し、しかもこの HEF は、RF の腸管吸収を阻害するばかりでなく、flavokinase を拮抗的に阻害するアンチビタミン効果を持つことを報告している。我々は、ここ数年間に亘る牛乳の RF についての研究を通じて、HEF を検出していない。むしろ HEF は彼等の用いた複雑な方法により引き起こされたアーティファクトの可能性が大きいと推察されるので、彼等の方法を追試し、HEF の牛乳での存在の有無を確認する必要がある。

昨年度の助成によって牛乳のフラビン (RF、FMN、FAD、その他) を簡易に分離定量する方法を確立したことを報告した。本年度の研究では、Roughead & McCormick による方法を追試し、我々の簡易分離定量法 [2] と比較し、牛乳における HEF の存在の有無を明確にする。

実験方法

1. Kannoらによる牛乳のフラビンの簡易定量法 [2]

牛乳1.0 g を3分間煮沸し、水道水で冷却後、プロナーゼを試料蛋白質の1/50量を加え、45℃で1時間インキュベートし、その量を最終的に2.0 g に10mM NaH₂PO₄ (pH5.5) で調整し、遠心分離 (12,000×G、10分) 後その上清をろ過し (0.45 μm)、これの100 μl を高速液体クロマトグラフィー (HPLC、SP-8700) に注入し、分離定量した。C18逆相カラム (4.6×250mm、5 μm、CapcellPak、資生堂) を用い、溶出は、40℃で、90%メタノール水溶液の35%から95%までと10mM NaH₂PO₄ (pH5.5) の65%から5%までの直線勾配で行った。流速は0.8ml/min で、溶出液の蛍光強度は励起波長462nm、蛍光波長520nmで測定した。

2. Roughead & McCormickによる牛乳のフラビンの定量法 [1]

牛乳25.0 gに4℃でトリクロール酢酸6.25 gを加え(最終濃度20%、w/w)、遠心分離(4℃、3000rpm、20分)し、上清を濾過後、濾液を4 M K_2HPO_4 で中和し(pH6.8)、4℃で60分間インキュベートし、これを再び遠心分離した(4℃、12,000rpm、20分間)。上清に硫酸アンモニウム粉末を加えて飽和にし、遠心分離した。更にこの上清に1/10量の80%(w/w)フェノールを加え、激しく攪拌後、遠心分離し(4℃、3000rpm、5分間)、上層のフェノール層を除去した。下層は再び80%フェノールで同様に抽出し、1回目のフェノール層と合わせた。このフラビンを含むフェノール層の等量の蒸留水を加え、続いて等量のジエチルエーテルで飽和した冷水で2回抽出して、下層部を集めた。これをロータリーエバポレータで濃縮し、重量を測定後、その一定量(100 μ l)を、1と同様に、HPLCに注入し、分別定量した。この場合のHPLCの溶出液は、Aとして50mM酢酸アンモニウム(pH6.0)、Bとして100%メタノールを使用し、Aの100%を2分間保持し、その後A79%—B21%を6分間保持し、さらに17分後A50%—B50%とし、その2分後にA30%—B70%として2分間保持した。流速は1.5ml/minであった。

3. 10-(2'-hydroxyethyl)flavin (HEF) の合成 [3]

3-1. 7,8-dimethyl-10-formylethyl-isoalloxazine の合成

リボフラビン1.14 gを褐色フラスコにとり、アイスバス中で2 N H_2SO_4 30mlを加え、更に、過ヨウソ酸水溶液18mlを加え、アイスバス中で攪拌し、更に室温で1時間攪拌した。これに結晶炭酸ナトリウムを加えてpHを1.5とし、30分間攪拌後濾過した。濾液に再び炭酸ナトリウムを加えてpHを3.8としてから濾過し、残渣を冷水(約100ml)、エタノール、ジエチルエーテル(少量)で順次洗浄後乾燥した。

3-2. 10-(2'-hydroxyethyl)flavinの合成

3-1で得た7,8-dimethyl-10-formylethyl-isoalloxazine (0.62 g)を十分に冷却した0.1N NaOH (20ml)に溶解し、これに水素化ホウ素ナトリウム(0.5ml)を加え、室温で約2時間攪拌した。この溶液をアイスバス中で、酢酸でpHを4.0—4.5に調整した後に濾過し、残渣を蒸留水で十分に洗浄し、低濃度の酢酸、アセ

トンで洗浄し、乾燥し、回収した。HEF は、展開溶媒としてメタノール：蒸留水（1：1、v/v）および固定相として Kieselgel 60 (Merck) を用いた薄層クロマトグラフィーで紫外線ランプ下で単一のスポットを示した。

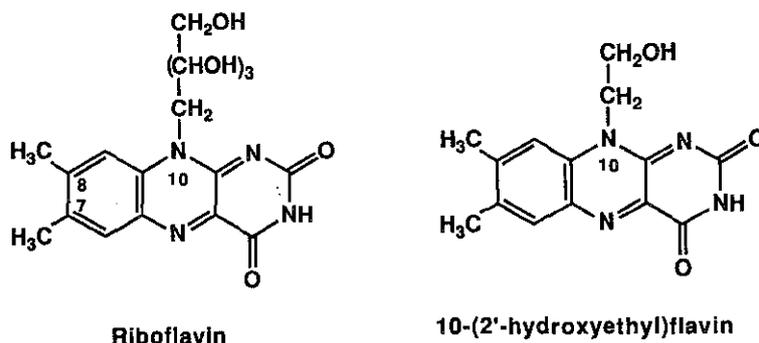


図 1 . リボフラビン及び10-(2'-hydroxyethyl)flavinの化学構造

結果

本研究では、1) Kannoらの方法並びに 2) Roughead & McCormickの方法で牛乳から抽出したフラビンを、(1)Kannoらの用いた溶出液 I および(2)Roughead & McCormick が用いた溶出液 II で HPLC を行い、分析した結果を比較した。さらに、合成した HEF と各抽出物とのコクロマトグラフィーを行うことによって HEF の有無を比較した。

1. Kannoらの方法で抽出した牛乳フラビンの分別定量

1-1. Kannoらの方法によって抽出した牛乳のフラビンの溶出液 I による HPLC パターンは、図 2-A に示されているように、FAD、FMN 及び RF から構成されている。また HEF の主ピークは、同じ条件下で、保持時間約 7.7 分に溶出された (図 2-B)。牛乳からのフラビン抽出液に HEF を加えてコクロマトグラフィーを行うと、HEF は RF よりもやや遅れて溶出され、HEF は各フラビンとは明確に分離されることが明らかである (図 2-C)。従って、本方法による抽出物中には HEF は含まれていなかった。

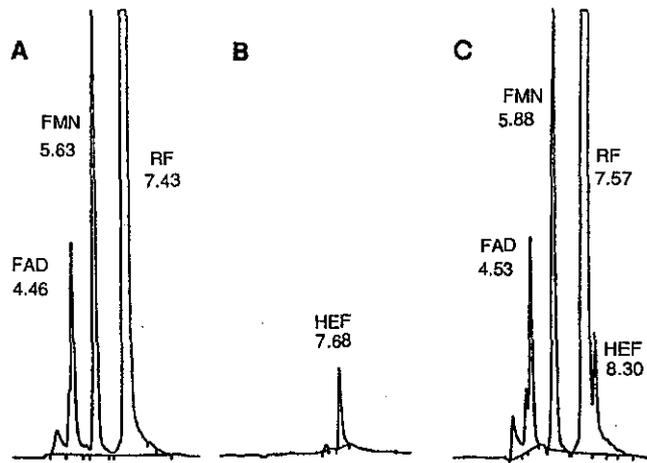


図2. Kannoらの方法によって牛乳から抽出したフラビン(A)、10-(2'-hydroxyethyl)flavin (B)及び両者の混合物(C)の溶出液IによるHPLCパターン
 溶出液I: 10 mM NaH₂PO₄と90%メタノール、数字は保持時間(分)を示す。

1-(2). 1-(1)と同じ試料を溶出液IIでは、溶出された各フラビンの保持時間は異なるが、1-(1)と同様なパターンを示した(図3-A)。同条件下で、HEFは2つのピークに分離された(図3-B)。ピークAはRFと同じ保持時間を示した。

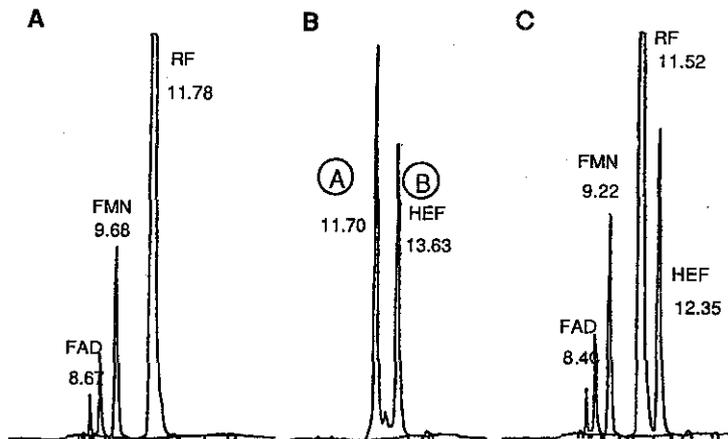


図3. Kannoらの方法によって牛乳から抽出したフラビン(A)、10-(2'-hydroxyethyl)flavin (B)及び両者の混合物(C)の溶出液IIによるHPLCパターン
 溶出液II: 50 mM 酢酸アンモニウムと100%メタノール、数字は保持時間(分)を示す。

この HEF を牛乳抽出フラビンとコクロマトグラフィーを行うと、図2-でのピークAはRFと同じ保持時間を示した。ピークBはRFよりもやや遅れて溶出され(図3-C)、これはHEFであると確認された。

Kannoらの方法によって抽出したフラビン含量は溶出液IとIIによる差異は認められなかった。(表1-A)。

2. HEF の牛乳フラビン抽出・分別定量

2-(1). Roughead & McCormickの方法で牛乳から抽出したフラビンの溶出液IによるHPLCパターンを図4-Aに示す。溶出された主ピークは2つで、それぞれはFADおよびRFと同じ保持時間を示した。HEFは図3-Bと同様である(図4-B)。HEFは牛乳抽出フラビンとのコクロマトグラフィーによって、RFよりもやや遅れて溶出されることは図3-Cの場合と同じである。Roughead & McCormickによって指摘されているように、本抽出法で得られたフラビン抽出物にはFMNは検出されなかった。

2-(2). Roughead & McCormickの方法で牛乳から抽出したフラビンを溶出液IIによって分析されたHPLCパターンを図5-Aに示す。主ピークはRFとFAD

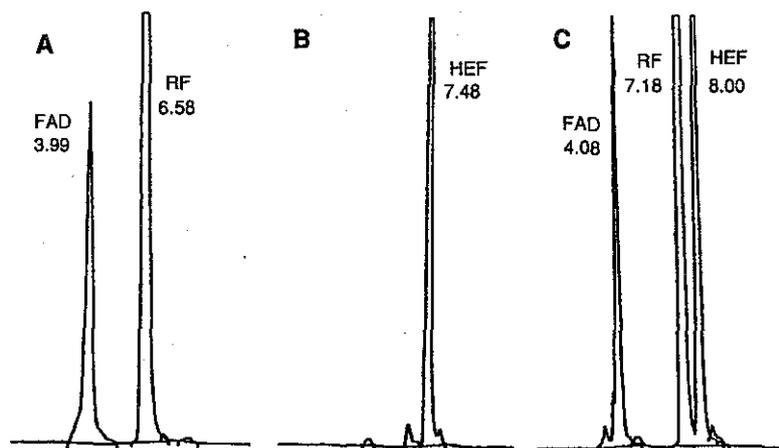


図4. Roughead & McCormickの方法によって牛乳から抽出したフラビン(A)、10-(2'-hydroxyethyl)flavin (B)及び両者の混合物(C)の溶出液IによるHPLCパターン
溶出液I: 10 mM NaH₂PO₄と90%メタノール、数字は保持時間(分)を示す。

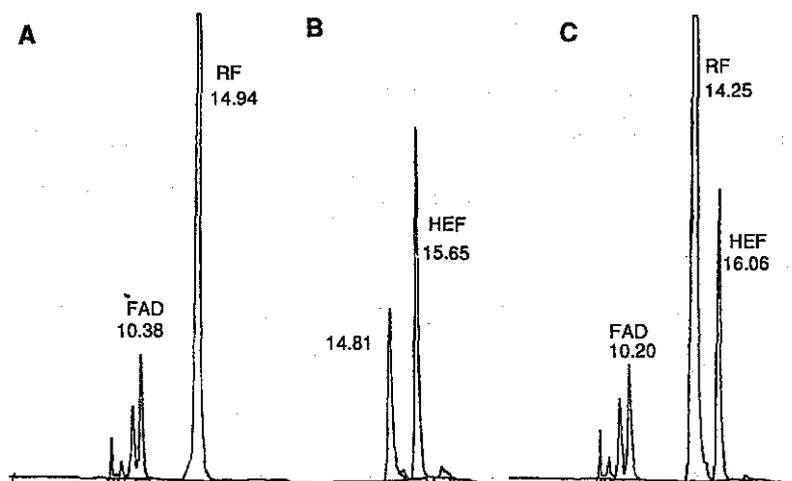


図5. Roughead & McCormickの方法によって牛乳から抽出したフラビン(A)、10-(2'-hydroxyethyl)flavin (B)及び両者の混合物(C)の溶出液IIによるHPLCパターン
 溶出液II: 50 mM 酢酸アンモニウムと100%メタノール、数字は保持時間(分)を示す。

で、その他に3つのピークが検出された。HEFは、図3-Bと同様に、2つのピークに分離された(図5-B)。両者のクロマトグラフィーでは主ピークのRFよりやや遅れてHEFが溶出された。本研究でもFMNはRoughead & McCormickの結果と同様に検出されなかった。しかし、Roughead & McCormickによって指摘されているHEFは本実験で検出されなかった。彼らの方法によるフラビン抽出物におけるRF含量はKannoらのそれよりも低い値を示した(表1-B)。

表1. 2種の方法で牛乳から抽出したフラビンの含量と組成の比較

	溶出液 I				溶出液 II			
	$\mu\text{g}/100\text{g}$ 牛乳	重量%	nmol/ 100g牛乳	mol%	$\mu\text{g}/100\text{g}$ 牛乳	重量%	nmol/ 100g牛乳	mol%
A. Kannoらによる簡易定量法								
FAD	17.4	12.0	22.1	6.3	15.4	12.6	19.6	6.6
FMN	8.5	6.0	18.5	5.2	8.4	6.9	18.3	6.1
RF	118.0	82.0	313.5	88.5	98.4	80.5	161.4	87.3
B. Roughead & McCormickによる定量法								
FAD	30.0	24.9	57.1	19.2	28.3	27.3	44.5	18.2
FMN	-	-	-	-	-	-	-	-
RF	90.5	75.1	240.3	80.8	75.5	72.7	200.7	81.8

考察

Roughead & McCormick は、牛乳には重量%で、FAD が13—45%、RF が35—60%、HEF が11—19%、その他が含まれており、FMN は検出されないと報告している。HEF の存在、FMN の欠在、RF 比率の減少はこれまでの報告とかなり異なっている。本実験でも、Roughead & McCormick の方法では FMN を検出できなかった。また、Roughead & McCormick で HEF が検出できなかった。このことは用いた試薬に起因しているのかも知れないので、その点を確認する実験を進めている。

牛乳に HEF の様なアンチビタミン効果を持つ物質は存在しないことが確認された。アンチビタミン効果をも持つ HEF の存在の有無を確認しておくことは牛乳の真の栄養価の評価と牛乳の普及の観点からも重要である。

参考文献

- 1) Roughead, Z. K. & D. B. McCormick, J. Nutr., 120, 382—388 (1990)
- 2) Kanno, C., Shirahuji, & T. Hoshi, J. Food Sci., 56, 678—681 (1991)
- 3) Fall, H. H. & H. G. Petering, J. Am. Chem. Soc., 78, 377—380 (1956)