

論文要旨

LC-MS3 によるビタミン E 分析法の開発及び植物中のビタミン E 分布に関する研究

井上 智子

ビタミンは、生体内の代謝やその他の生理現象を円滑に行わせて生体を維持する上で重要な栄養素の一つである。その中でも抗酸化力を持つビタミン E は我が国の三大疾病の一つである動脈硬化を予防する可能性が示唆されており、ヒトの健康を維持する上で特に重要なビタミンの一つである。ヒトはビタミン E を体内で合成することができないため食品や食用植物、薬用植物などから摂取する必要があり、食品や植物中のビタミン E の存在や形態を把握することは健康を維持する上において重要である。

ビタミン E はトコフェロール及びトコトリエノールに結合するメチル基の位置によってそれぞれ α , β , γ , δ の合計 8 種類の同族体を有する。これら 8 種類同族体の存在は蛍光検出器付き HPLC を用いた同時分析法によって確認されているが米ぬか、米、大豆油、小麦及び種子に限定されており、特に植物の光合成に寄与する葉、茎におけるビタミン E 同族体 8 種類の分析報告が少ないため、これら同族体の存在はほとんど知られていない。そこで、本研究では植物の光合成部位に着目し、その中のビタミン E 8 種類の存在を知ることを目的として高感度で且つ迅速なビタミン E 8 種類同族体の同時分析法の開発に取り組んだ。

ビタミン E 8 種類の同時分析法を開発するにあたり食品、植物分野以外の生化学、薬学分野で用いられているさまざまな分析法を確認したところ LC/MS3 が有用であることがわかった。そこで本研究では LC/MS3 に焦点を絞り、この方法を用いて植物中におけるビタミン E の 8 種類同族体の同時分析法を検討した。

LC-MS3 を用いた同時分析法は次の 3 段階を経て確立した。①最適なイオンスプレー電圧、イオンソースガス圧及びカーテンガス圧を選択して各同族体の高感度なプロトン付加分子を得た。次に MS2 イオンを得るために最適なオリフィスプレート電圧、衝突室内外の電圧とガス圧、イオン化部のガス圧を設定し、続いて溜めこみ時間を設定して最終的に MS3 イオンを得た。②個々の MS3 イオン化条件を一つの分析条件に設定することにより、MS3 による同族体 8 種類の同時分析法を確立した。③ HPLC の分離に最適な PFP カラムを選択し、40°C のカラム温度、水:メタノール (10:90, v/v) の移動相を用いることによって 8 種類同族体の分離を可能にした。これによってビタミン E 同族体 8 種類の LC-MS3 を用いた同時分析法を新規に確立することができた。また LC/MS や LC/MS2 に比べて直線性、相関性及び分析感度が優れていることが標準溶液によって確認でき、植物抽出液中に同族体 8 種類の混合標準溶液を添加したところ、本法は LC/MS2 に比べて夾雑物の影響が少なく高感度に分析できることが明らかになった。

LC-MS3 を用いることにより、植物中でのこれら同族体の存在を把握することが可能になった。そこで、様々な地域を原産とする 92 種類の植物中の葉、茎、枝、花、穂、蕾における同族体の存在の解明を行った。

92 種類中 α -トコフェロールは全ての植物の全ての部位に存在し、 γ -トコフェロールと組み合わせて存在する傾向にあることがわかった。 α -トコフェロールは抗酸化力が強く、植物内で産生された活性酸素種による植物細胞の酸化傷害を防ぐ働きがあることから、全ての植物で α -トコフェロールの存在が認められたのは植物の生命維持のためにその存在が重要であるためと考えられた。また、 α と γ -トコフェロールが組み合わせて検出されたのはビタミン E の生合成経路に起因し、 γ -トコフェロールは植物の生命維持に重要な α -トコフェロールの前駆体であることによると推測された。

また、トコトリエノールは種子の発芽に関与し、植物の成長の初期段階に検出されることが知られているが、本研究結果からトコトリエノールは発芽以降においても存在することが初めて明らかになった。また、トコトリエノールは亜熱帯から熱帯地域の宮古島やマダガスカルを原産とする植物に特異的に認められ、この地域は高温多湿で紫外線照射が強く土壌に塩分を含む特殊な環境であった。そこで、植物の生育環境とトコトリエノールの産生に及ぼす影響に着目した。温度とトコトリエノールの産生の関係を示す直接的な知見はないが、 α -トコフェロールは植物の低温ストレスが光合成の電子伝達系を抑制して活性酸素種を増加させることが知られている。このことから過酷な温度条件が植物ストレスとなりトコトリエノールの産生を引き起こした可能性が推測された。また、再現性は認められなかったが、UVB 波長域の紫外線照射によって α -トコトリエノールの産生が増加した。UVB 波長域は植物内で活性酸素種を産生させて細胞の損傷を引き起こす。また紫外線の他に塩分ストレスによっても活性酸素種が産生され、植物に酸化傷害を起こすことが知られている。このことから、温度、紫外線や土壌の塩分などの環境要因が植物ストレスとして複合的に作用することにより過剰に産生された活性酸素種の防御機能として比較的抗酸化力の強い α -トコトリエノールが産生される結果になったと推測された。

以上、本研究では LC-MS3 を用いたビタミン E8 種類同族体の同時分析法を新たに確立することによりさまざまな植物中でのビタミン E 同族体の存在を明らかにすることができた。この研究成果は、未だ解明されていない植物中のビタミン E の生合成経路や植物内のビタミン E 動態に関する研究に貢献できると考える。

本法を食品分野に応用することにより、様々な食品中のビタミン E 同族体の未知の存在を解明することが可能になる。特に、我が国は TPP への参加が予定されており、今まで経験したことがない輸入食品の安全性を確保する必要性が高まりつつある。本研究で開発した LC/MS3 は夾雑物中の目的物質の微量分析に最も適した分析法であり、輸入食品の安全性を水際で迅速に確保する上で有用であると考えられる。さらに、どの食品部位にどの程度のビタミン E 同族体が存在しているのかが把握できることは栄養学的にも重要であり、ヒトの健康を守る上においても役立つと考える。