

ノート

波長選別した光照射と ESR を組み合わせた OH ラジカル消去能評価システムの開発

中川 清子*¹⁾ 関口 正之*¹⁾

Estimation of relative reaction rate of hydroxyl radical using spin-trapping ESR combined with wavelength-selected photolysis

Seiko Nakagawa*¹⁾, Masayuki Sekiguchi*¹⁾

キーワード : スピントラップ ESR, OH ラジカル

Keywords : Spin-trapping ESR, Hydroxyl radical

1. はじめに

生体内では、代謝の過程や紫外線の暴露等により、OH ラジカル・一重項酸素・酸素分子アニオンなどの活性酸素種が生成する事が知られている。これらの活性酸素種は、酸化ストレスとなり発ガンや疾病の原因になる事から、抗酸化物質を含んだ食品が付加価値の高い食品として注目され、抗酸化作用の評価に関する需要が高まっている。活性酸素除去能の測定法としては、DPPH (2, 2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル・ラジカル) の除去能を分光測定する方法、フルオレセイン等の蛍光物質の酸化度を測定する方法 (ORAC 法)、活性酸素由来のラジカルを電子スピン共鳴 (ESR) で測定する方法などがある。

ESR 法は、活性酸素種の発生源とラジカルを捕獲するスピントラップ剤を含んだ溶液に試料の水溶液を添加し、光照射等で生成した活性酸素種の ESR スペクトルを測定する。試料の添加により、生成する活性酸素種由来のラジカル量が減少すれば、抗酸化性があると評価される。この様に、ESR 法は特定の活性酸素種を生成させて測定できる、実際の生体内での反応系に近い等、の理由により正確な評価法として期待されている。

ESR 法において、OH ラジカル生成のために、ほとんどの研究例では、水銀ランプの紫外線を過酸化水素水に直接照射している。しかし、抗酸化物質の一種であるフェノール類は、水銀ランプの紫外線を吸収し、電子を放出する事がわかっている⁽¹⁾。放出された電子は、過酸化水素と反応し、OH ラジカルを再生するため、正確な評価ができない可能性がある。そこで、抗酸化物質の吸収がない波長領域の紫外線を過酸化水素水に照射し、OH ラジカルを再生する条件を検討した。昨年度の研究で、過酸化水

素 : 1~1.25 mM, DMPO (5, 5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド, スピントラップ剤) : 200~500 μM の系に 300~400 nm の紫外線を選択的に照射すると、ヒドロキノンの添加に伴い DMPO-OH ラジカルが減少する事がわかった⁽²⁾。そこで、この条件で、数種のポリフェノール類の OH ラジカル消去能の評価を行ったので、報告する。

2. 実験方法

実験装置の外観を図1に示す。過酸化水素 : 1~1.25 mM, DMPO : 200~500 μM に調整した水溶液にポリフェノール類 (カテコール, レソルシノール, ヒドロキノン, ピロガロール) やチミジンの水溶液を試料混合装置を用いて添加し、B370 フィルターで分光した 300~400 nm の紫外線を 10 分間照射した。照射後、速やかに ESR スペクトルを測定し、生成した DMPO-OH ラジカルを定量した。ポリフェノール類の添加による DMPO-OH 生成量の減少割合から、ポリフェノール類と OH ラジカルとの反応速度比を見積もった。

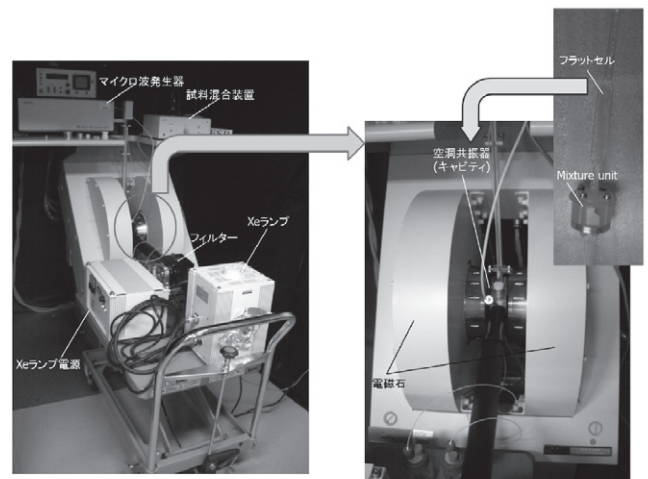


図1. 実験装置の外観

3. 結果及び考察

ヒドロキノン添加時のESRスペクトル変化を図2に示す。すべての抗酸化物質で、添加量が増加するとDMPO-OHが減少した。

DMPOとOHラジカルの反応速度を k_1 、抗酸化物質とOHラジカルの反応速度を k_2 、抗酸化物質無添加及び濃度 $[S]$ で添加した時のDMPO-OHの生成濃度をそれぞれ $[DMPO-OH]_0$ 、 $[DMPO-OH]_t$ とすると、

$$\frac{[DMPO-OH]_0}{[DMPO-OH]_t} = 1 + \frac{k_2[S]}{k_1[DMPO]}$$

と表される。

図3に、 $[DMPO-OH]_0/[DMPO-OH]_t$ を抗酸化物質とDMPOの濃度比に対してプロットした。図3の傾きから抗酸化物質のOHラジカルとの反応速度係数が得られた(表1)。ヒドロキノンのOHラジカルとの反応速度係数を1.0とした時の反応速度比の傾向は、パルス電子線を照射してラジカルの吸収を直接測定したパルスラジオリシス法での測定値の比とよく一致している。この結果から、ポリフェノール類の吸収帯を避けた波長の紫外線を照射する事により、精度の高いOHラジカル消去能の評価ができる事がわかった。

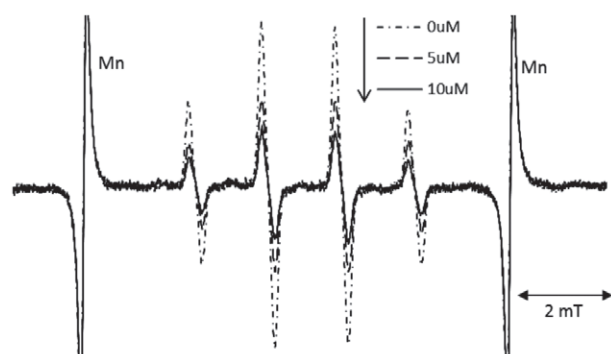


図2. ヒドロキノンの添加によるDMPO-OHラジカルの減少

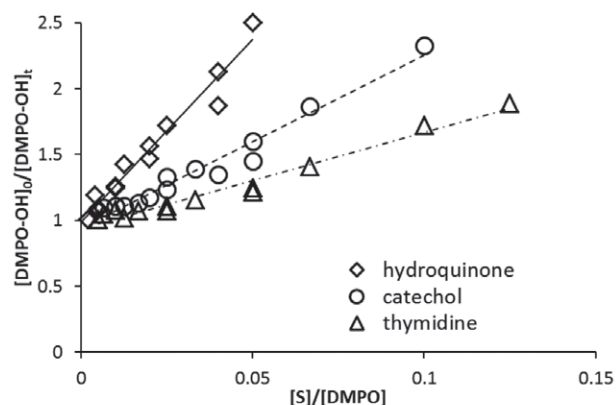


図3. OHラジカルに対するポリフェノール類とDMPOの反応速度比

表1. OHラジカルとポリフェノール類の相対反応速度比

scavenger	apparent relative rate constant ^a	relative ratio ^b	rate constant (10 ¹⁰ M ⁻¹ sec ⁻¹) ^c	relative ratio ^d
hydroquinone	27.7	1.00	2.1 ^{e,f}	1.00
catechol	13.1	0.47	1.1 ^f	0.52
resorcinol	12.5	0.45	1.2 ^f	0.57
pyrogallol	9.5	0.34	-	-
thymidine	7.3	0.26	0.46 ^{e,f}	0.22

a) 図3から得られた反応速度

b) a)の相対比

c) パルスラジオリシス法で得られた絶対反応速度定数

d) c)の相対比

e) Ebart ら⁽³⁾

f) Buxton ら⁽⁴⁾

今後、光照射以外の手法とESRを用いた抗酸化能評価システムについても検討する予定である。また、これらの成果を食品の抗酸化能評価や化粧品紫外線除去能評価の試験に繋げていく。

(平成25年7月22日受付, 平成25年8月19日再受付)

文 献

- (1) K. Ohara, A. Shimizu, Y. Wada and S. Nagaoka: "Photochemical formation and decay of tocopheroxyl radical in vitamin E emulsion: A laser photolysis.", *J. Photochem Photobiol A*, 210, pp.173-180 (2010)
- (2) 中川清子, 関口正之: 「ESRを利用したOHラジカル消去能測定システムの検討」, 東京都立産業技術研究センター研究報告, 7, pp.122-123 (2012)
- (3) M. Ebert, J. P. Keene, A. J. Swallow and J. H. Baxendale: "Pulse Radiolysis", Academic Press, New York (1965)
- (4) G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman and A. B. Ross: *J. Phys. Chem. Reference Data*, 17, p.513 (1988)