

1P045

スピントラッピング ESR と放射線照射を利用した OH ラジカルとの 反応速度比の検討

(都立産業技術研究センター) ○中川清子

Estimation of relative reaction rate of hydroxy radical using ESR spin trapping combined with water radiolysis

(Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute) Seiko NAKAGAWA

[序] OH ラジカルをはじめとした活性酸素種は、酸化ストレスとなり発ガンを引き起こすことから、抗酸化作用の評価に関する需要が高まっている。活性酸素種をスピントラップ剤で捕獲し、抗酸化物質の添加によるラジカルの減少を ESR で評価する手法は、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。

OH ラジカルの生成法としては、フェントン反応や過酸化水素水の紫外線照射が利用されてきた。しかし、前者は生成した OH ラジカルが後続反応を起こすため、濃度の制御に問題がある。また、後者は、添加する抗酸化物質が紫外線を吸収すると正確な評価ができない可能性がある。特に、抗酸化物質として知られているポリフェノール類では、光誘起により生成する励起状態から電子を放出する¹⁾。放出された電子は過酸化水素と反応して OH ラジカルを生成するため、正確な消去能の評価ができない。そこで、水の放射線分解を利用した OH ラジカル消去能の評価を検討した。

[実験] 水に放射線照射すると、OH ラジカル以外の活性種として、溶媒和電子やプロトンも生成する。溶媒和電子やプロトンはスピントラップ剤と反応する²⁾ため、電子捕獲能の高い亜酸化窒素を添加して溶媒和電子を OH ラジカルに変換した。

スピントラップ剤 DMPO と抗酸化物質を溶解した水溶液を亜酸化窒素でバブリングし、送液ポンプでフローした。フローの途中で、直径 1cm の穴をあけた厚さ 5cm の鉛製コリメーターを通して X 線 (電圧: 450kV、電流: 10mA) を照射した。照射した溶液は ESR 測定用の扁平セルに導入し、生成した DMPO-OH ラジカルを定量した。

[結果および考察] 50 μM の DMPO に対してチミジン 0 μM, 8 μM, 16 μM を添加した水溶液に X 線を照射して得られた DMPO-OH のスペクトル変化を図 1 に示す。チミジンの添加量が増加するに伴い、DMPO-OH の生成量が減少することがわかる。

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 、抗酸化物質無添加および濃度 $[S]$ 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、

$$[DMPO-OH]_0/[DMPO-OH]_t \propto 1+k_2[S]/k_1[DMPO]$$

と表現できる。

$[\text{DMPO-OH}]_0/[\text{DMPO-OH}]_t$ を抗酸化物質と DMPO の濃度比に対してプロットすると切片を 1 とした一次の直線が得られ、傾きが OH ラジカル消去能に比例する値となる。チミジン、p-クマリン酸、マンニトールの DMPO との濃度比に対する競争反応： $[\text{DMPO-OH}]_0/[\text{DMPO-OH}]_t$ のプロットを図 2 に示す。図 2 から得られた傾きの比を表 1 に示す。得られた OH ラジカル消去能の比（第 3 カラム）は、パルスラジオリシス法で求められている OH ラジカルとの反応速度定数の比（第 5 カラム）とよく一致していることがわかる。

当日は、ポリフェノール類についても議論する。

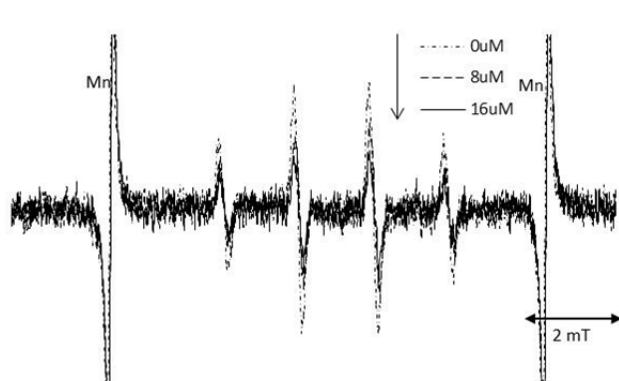


図 1 チミジン添加による DMPO-OH 生成量の減少

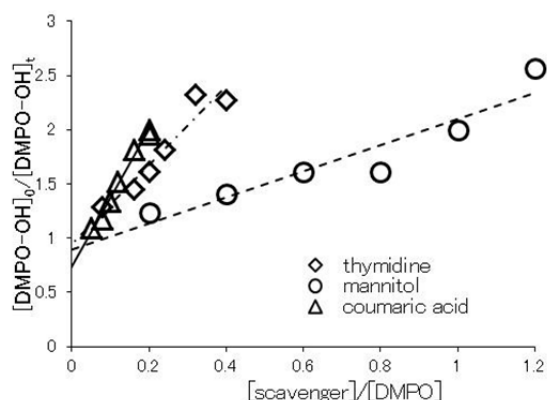


図 2 抗酸化物質と DMPO の競争反応

表 1 OH ラジカルとの相対反応速度比

reactant	apparent relative rate constant ^a	relative ratio ^b	rate constant ^c / $10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	relative ratio ^d
p-coumaric acid	6.3	1.00	8.7	1.00
thymidine	3.6	0.57	4.8	0.55
mannitol	1.2	0.19	1.5	0.17
a. The value was obtained as a slope of the competition plot.				
b. The apparent rate constant relative to that of p-coumaric acid obtained in this work.				
c. The values were obtained by pulse radiolysis. ³⁾				
d. The rate constant relative to that of p-coumaric acid obtained in the previous studies.				

参考文献：

- 1) K. Ohara, A. Shimizu, Y. Wada, and S. Nagaoka, *J. Photochem Photobiol A*, 210 (2010) 173.
- 2) T. Oka, S. Yamashita, M. Midorikawa, S. Saiki, Y. Muroya, M. Kamibayashi, M. Yamashita, K. Anzai, and Y. Katsumura, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 9600.
- 3) G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, and A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 17 (1988) 513.