

2P025

スピントラッピング ESR と放射線照射を組み合わせた OH ラジカル

および O_2^- 消去能の測定

(都立産業技術研究センター) ○中川清子

Estimation of the counter-activity to eliminate OH radical and O_2^-
using ESR spin trapping combined with water radiolysis

(Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute) Seiko NAKAGAWA

[序] 代謝の過程や紫外線の暴露などにより、生体内に生成する OH ラジカルや O_2^- などの活性酸素種は、酸化ストレスとなり発ガンを引き起こすことが知られている。このため、抗酸化性の高い食品・医薬品の開発が進められており、抗酸化能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。

ESR 法において、多くの研究例では、過酸化水素の紫外線分解により OH ラジカルを生成法している。しかし、抗酸化物質の一種であるフェノール類では、光誘起により生成する励起状態から電子を放出することが知られている。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。一方、放射線防護の観点から、水の放射線分解で生成する OH ラジカルや O_2^- と化学物質の反応速度について、多くの研究が行われてきた。そこで、水の放射線分解と ESR 法を組み合わせた OH ラジカルおよび O_2^- 消去能の評価法を検討した。

[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。

O_2^- 消去能の評価では、ギ酸ナトリウムを使用して OH ラジカルを CO_2 に変換後、溶存酸素に電荷移動させて O_2^- を生成させた。 O_2^- 生成には、高線量率での照射が必要なため、低エネルギー電子線照射 (電圧: 250kV、電流: 1mA、照射速度: 60m/min) を行った。また、DMPO- HO_2 ラジカルの寿命は数分と短いため、スピントラップ剤は CYPMPO を用いた。調整した水溶液 50uL を直径 5mm 高さ 2mm のステンレス容器に入れ、Al 箔をかぶせて、両面テープで照射用トレイに固定し照射した。照射した溶液は毛細管に採取し、生成した CYPMPO- HO_2 ラジカルを定量した。

[結果および考察] 抗酸化物質の添加量が増加するに伴い、トラップされたラジカルの生成量が減少した。スピントラップ剤と活性酸素種の反応速度を k_1 、抗酸化物質と活性酸素種の反応速度を k_2 、抗酸化物質無添加および濃度 $[S]$ で添加した時のラジカルの生成濃度をそれぞれ $[\text{ラジカル}]_0$ 、 $[\text{ラジカル}]_t$ とすると、

$$[\text{ラジカル}]_0/[\text{ラジカル}]_t \propto 1+k_2[S]/k_1[\text{スピントラップ剤}]$$
と表現できる。

$[\text{ラジカル}]_0/[\text{ラジカル}]_t$ を抗酸化物質とスピントラップ剤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、傾きが活性酸素種除去能に比例する値となる。抗酸化物質とスピントラップ剤の濃度比に対する競争反応： $[\text{DMPO-OH}]_0/[\text{DMPO-OH}]_t$ および $[\text{CYPMPO-HO}_2]_0/[\text{CYPMPO-HO}_2]_t$ のプロットを図 1、2 に示す。図 1 から得られた傾きの比を表 1 に示す。得られた OH ラジカル除去能の比（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）とよく一致した。

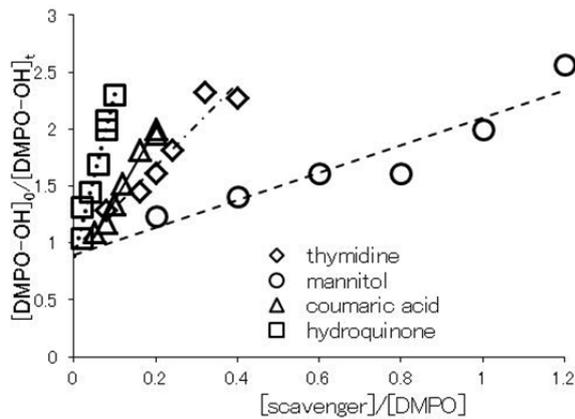


図 1 抗酸化物質と DMPO の競争反応

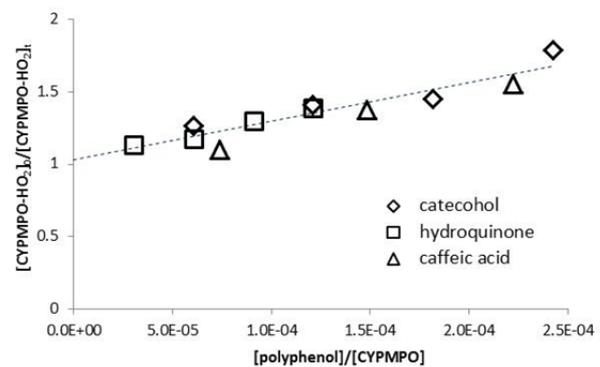


図 2 抗酸化物質と CYPMPO の競争反応

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
hydroquinone	15.6	2.48	20	2.30
catechol	7.3	1.16	11	1.26
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.¹⁾

d. The rate constant relative to that of p-coumaric acid obtained in the previous studies.

参考文献：

- 1) G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, and A. B. Ross, J. Phys. Chem. Ref. Data, 17 (1988) 513.