

2P160

蛍光検出法による懸濁液系での天然抗酸化剤のフリーラジカル消去速度測定

(愛媛大理) ○小原敬士・仲原英記・長岡伸一

【序】乳化分散系やオイル分散系のような懸濁系は、食品や写真フィルム・インクのような工業分野でよく見受けられる。このような懸濁した試料における化学反応の追跡では、一般に利用される透過吸収法を使用するのが困難な場合があるので、反射吸収や蛍光法が適用される。天然抗酸化剤によるフリーラジカル消去速度は、従来ストップフロー法で測定されてきたが、分光吸収測定を用いるため光学的透明度の低いこのような懸濁系では測定が困難であった。色剤や機能性分子が油滴状に分散された不均一な系で、酸化防止剤や天然抗酸化剤がどのような活性を持つか速度論的に検討することは興味深い。本研究では、蛍光検出型ストップフロー法により、生きた細胞を含むような生体系を目標とした透明度が低い懸濁液系でのフリーラジカル消去過程の速度論的研究を試みた。フリーラジカルモデルから抗酸化反応により生成する還元体の蛍光をプローブとし、このモデルラジカルとビタミン E 等の天然抗酸化剤の反応過程を蛍光の時間変化として追跡・解析し、消去速度定数を求めた。

【実験】蛍光検出型ストップフロー測定装置(ユニソク RSP-1000F)は、通常ストップフローミキサの吸収観測セル(光路長 1cm)を内径 2mm の蛍光用石英製円筒セルに交換し、励起光に対し 90 度及び 180 度方向のライトガイドから発光検出を可能にしたものである(図 6 参照)。300W キセノンランプを分光し蛍光励起光源とし、発光検出側には目的とする蛍光を選択的に透過し照射光・散乱光をカットするバンドパスフィルター(シグマ光機 UV32, 34U, or 36U)を用い、抗酸化剤溶液とフリーラジカル溶液の急速混合直後からの蛍光の時間変化を光電子増倍管で測定した。溶媒は主にエタノールを用い、試料溶液は窒素置換し、25°C で測定を行った。

【結果・考察】モデルフリーラジカル(ArO \cdot , 図 1)は抗酸化剤(AO)との反応によって還元体(ArOH)となる。(Scheme 1) α -Tocopherolと還元体 ArOH の蛍光及び蛍光励起スペクトルを図 2 に示す。還元体 ArOH のフェノール特有の蛍光は 350 nm 前後に存在し、抗酸化反応の進行にともない ArOH の蛍光強度の定量的な増加が見られることで、ArO \cdot 消去反応速度の測定が可能である。この還元体を抗酸化剤の吸収の妨害が少ない 264 nm で励起し、ArO \cdot 溶液と抗酸化剤溶液を 1:1 で急速混合し、300-400 nm 領域(36U 透過)の ArOH 蛍光の時間変化を測定した。図 3 に観測された蛍光の時間変化の一例を示す。この時間変化曲線を速度式に従って非線形回帰により解析し、擬一次の速度定数 k_{obs} を求めた。 k_{obs} の抗酸化剤濃度依存性から二次の速度定数 k_s が求められる(図 4)。エタノール溶液における α -Tocopherol, Epicatechin, BHT (Butylated hydroxytoluene), Ubiquinol-10 (図 1)についての吸収法と本法の結果を表 1 に示す。両者はよく一致し、本法で速度定数が精度よく求められることが確認できた。

Scheme 1:

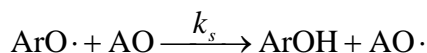


表 1 吸収法と蛍光法による k_s at 25°C

In Ethanol	$k_s / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	
	吸収法	蛍光検出法
α -Tocopherol	5.12×10^3	4.93×10^3
Epicatechin	9.12×10	1.04×10^2
BHT	3.50×10	3.36×10
Ubiquinol-10	5.19×10^3	5.13×10^3

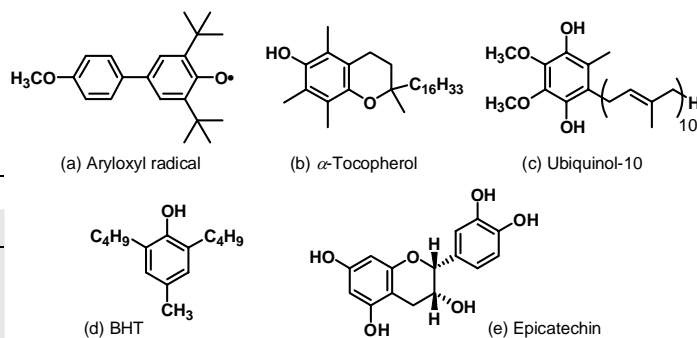


図 1 ArO \cdot と抗酸化剤の構造式

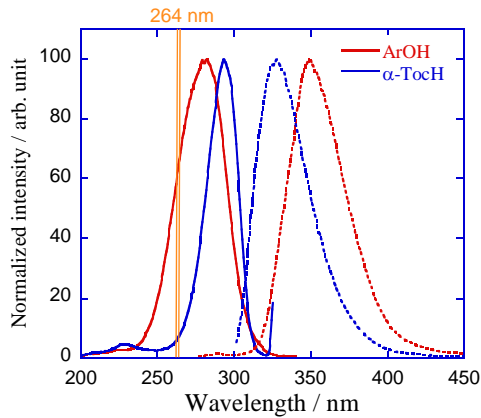


図2 蛍光(破線)及び蛍光励起(実線)スペクトル

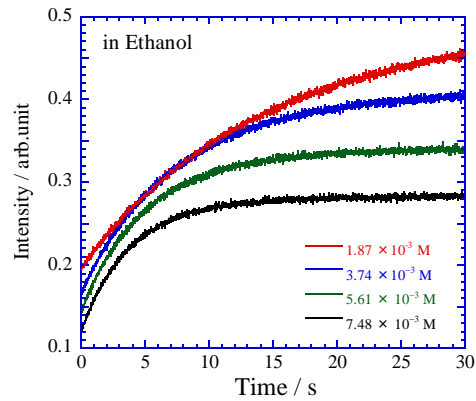


図3 抗酸化反応による蛍光の時間変化(BHT)

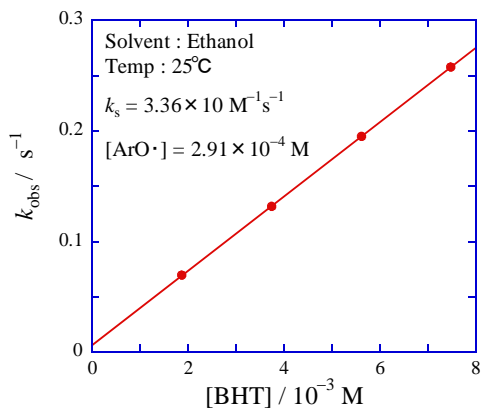


図4 抗酸化剤濃度 - k_{obs} のプロット(BHT)

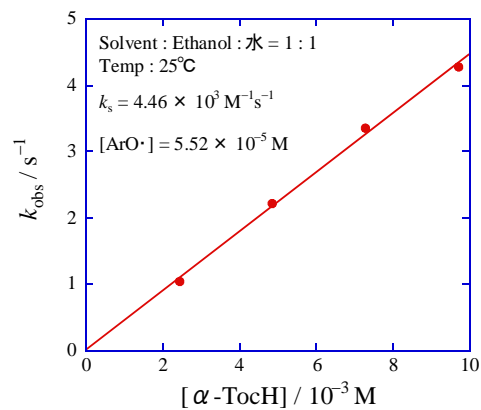


図5 懸濁系での抗酸化剤濃度 - k_{obs} のプロット

懸濁液系への応用: α -Tocopherolをエタノールに $\sim 10^{-3}$ M溶解し、この溶液を水と1:1で混合すると懸濁した溶液となる。これは、水/エタノール混合溶媒中に α -Tocopherolが十分に溶解しないため不溶分が微細な油滴となるため生じる。この懸濁溶液を用いて、蛍光法によるフリーラジカル消去速度の測定を行った。図5に示すように α -Tocopherolの仕込み濃度と k_{obs} に良好な直線関係が得られ、 $k_s = 4.46 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ が得られた。この値は、エタノール均一溶液中の値より10%程度小さい。この懸濁溶液中で α -Tocopherolは、均一相(水・エタノール混合溶媒)中に溶解した状態と、数 μm ~数十 μm の油滴となった状態で存在する。均一相の濃度は、仕込み濃度よりかなり低い($\sim 10^{-4}$ M)と考えられるにもかかわらず、反応速度の低下は予想よりも小さかった。このことは、油滴状態の α -TocopherolもArO \cdot 消去に有効に関与していることを示している。

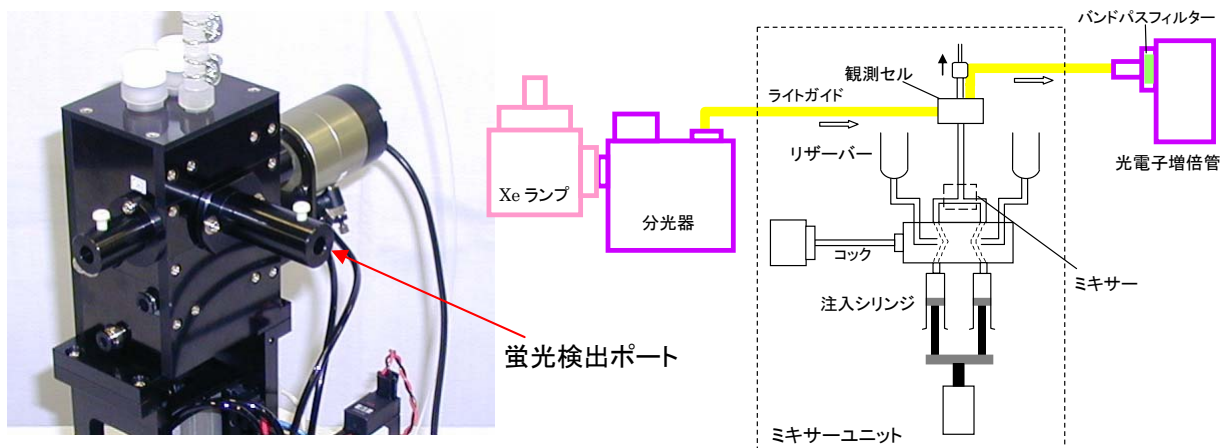


図6 蛍光検出型 Stopped-Flow 装置の概略図