

ESRを利用したOHラジカル消去能測定システムの検討

中川 清子*¹⁾ 関口 正之*¹⁾

Estimation of antioxidant activity by ESR measurements to eliminate OH radicals

Seiko Nakagawa*¹⁾, Masayuki Sekiguchi*¹⁾

キーワード: OHラジカル, 抗酸化能, 電子スピン共鳴

Keywords: OH radical, Antioxidant activity, Electron spin resonance

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・酸素アニオンなどの活性酸素種が生成する。これらの活性酸素種は、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、活性酸素種を除去する機能を持つ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⁽¹⁾、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)⁽²⁾、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⁽³⁾⁽⁴⁾などがある。

ESR 法では、一定量のラジカルが生成できる溶液に、抗酸化物質を含む試料を加え、発生するラジカル量が減少すれば、抗酸化性があると評価できる。一定量のラジカルが生成できる溶液には、活性酸素種を発生させる物質 (たとえば過酸化水素) と、活性酸素種を安定で長寿命のラジカルに変換するためのスピントラップ剤を含んだ溶液を用いる。また、ESR 法は活性酸素を発生させる物質を選択することによって、特定の活性酸素種を生成させて測定できること、実際の生体内での反応系に近いことなど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、活性酸素種である OH ラジカル生成のために、水銀ランプからの紫外線を過酸化水素水に直接照射する手法が用いられている⁽³⁾⁽⁴⁾。しかし、抗酸化物質の一種であるフェノール類の中には、300 nm 以下の紫外線を吸収し電子を放出するものがある⁽⁵⁾。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。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 ラジカルを消去能を評価するためのシステムを検討した。

2. 実験方法

予備実験において、水銀ランプの光を分光器で選択し光ファイバーで照射したが、光量が弱く、過酸化水素を分解できる波長が限られており、適当な波長の光を効率よく照射できなかった。このため、紫外線領域でも連続した波長域の光を得られるキセノンランプに光学フィルターで透過した光を使用することとした。

ポリフェノール類などの抗酸化物質の 300 nm 以下の紫外線の吸収を抑制するためには、300 nm 以上の波長の光を照射する必要がある。そこで、ESR 装置の紫外線照射システム用のフィルターのうち、U360 もしくは B370 (ともに、透過波長: 300~400 nm) を使用することとした。

図1に、OHラジカル消去能測定システムの概略図を示す。活性酸素種を発生させるための過酸化水素と、スピントラップ剤 DMPO (5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド) の水溶液と抗酸化物質 (例えば、ヒドロキノン) の水溶液を試料混合装置により、ESR キャビティー内にセットしたフラットセルに導入した。このセルにキセノンランプからの紫外線を照射して、OHラジカルを発生させた。抗酸化物質による紫外線の吸収を避けるため、フィルターU360 もしくは B370 を使用し、300~400 nm の UV 光を選択的に照射した。生成した OH ラジカルは DMPO でスピントラップし、DMPO-OH ラジカルとして ESR (日本電子製: JES-FA2) で観測した。DMPO-OH の生成量は、抗酸化物質の添加により減少する。過酸化水素と DMPO の濃度を変化させて、ヒドロキノンの添加量の増加に伴って DMPO-OH の生成量が減少する条件を検討した。

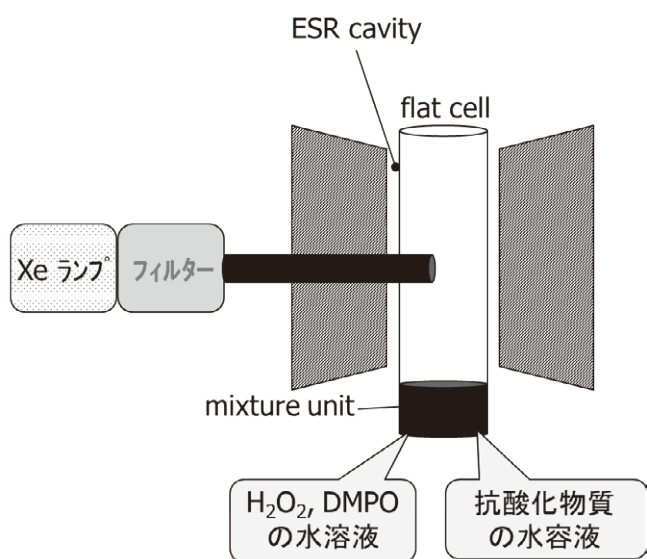


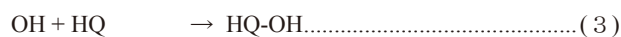
図1. OH ラジカル消去能測定システムの概略図

3. 結果及び考察

過酸化水素: 2.5 mM, DMPO: 200 μM でのヒドロキノン添加による DMPO-OH の生成量の変化を図2に示す。横軸にヒドロキノン濃度, 縦軸にヒドロキノン添加しない場合の DMPO-OH の ESR スペクトルの強度 ([DMPO-OH]₀) に対するヒドロキノン添加後の DMPO-OH の ESR スペクトルの強度 ([DMPO-OH]_t) の比をとり, 生成量の変化とした。

ヒドロキノンの添加量が 1~5 μM では, ヒドロキノンの添加量の増加によりむしろ DMPO-OH の生成量が増加した。この条件では, OH ラジカルの生成量が DMPO の濃度に対して高すぎるため, ヒドロキノンがない状態で DMPO-OH が OH ラジカルと反応して減少していた, と考えられる (反応式2)。ヒドロキノンを少量添加すると, DMPO-OH と反応していた OH ラジカルの分だけがヒドロキノン(HQ)と反応して, 見かけ上 DMPO-OH が増加した, と推測される。

<OH ラジカルの反応>



過酸化水素: 1 mM, DMPO: 200 μM 及び過酸化水素: 1.25 mM, DMPO: 500 μM でのヒドロキノン添加による DMPO-OH の生成量の変化を図3に示す。いずれも, ヒドロキノンの添加量の増加に伴い, DMPO-OH の生成量が減少している。また, DMPO の濃度が高い方が DMPO-OH の減少効率が低下する。

以上の結果から, U360 フィルターで波長選択した場合, 過酸化水素: 1~1.25 mM, DMPO: 200~500 μM で, ほぼ正確な抗酸化能の評価が可能と考えられる。今後は, この条件を用いて, 他のポリフェノール類や食品抽出物に対して抗酸化能の評価を検討する。

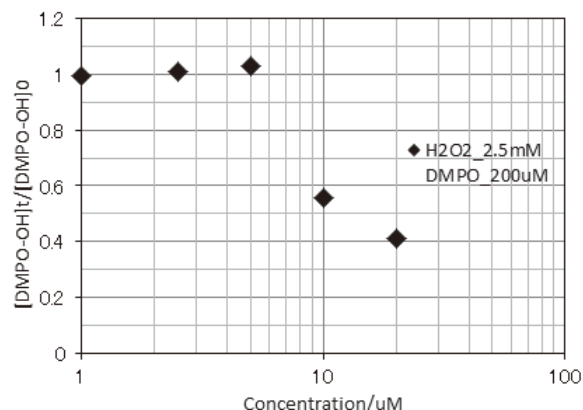


図2. 過酸化水素:2.5 mM, DMPO:200 μM, Filter:U360 でのヒドロキノン添加による DMPO-OH の生成量の変化

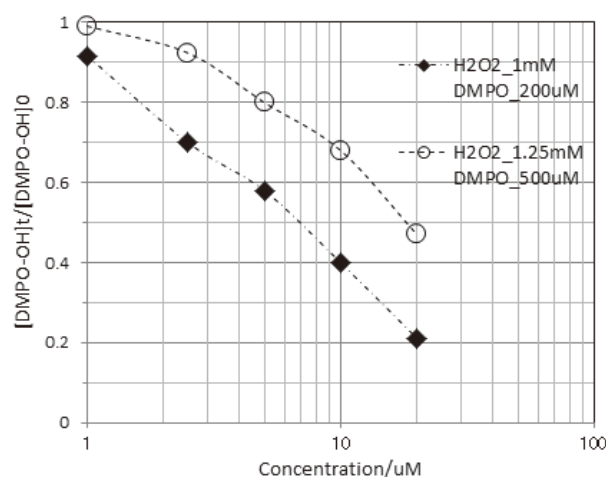


図3. 過酸化水素:1-1.5 mM, DMPO:200-500 μM, Filter:U360 でのヒドロキノン添加による DMPO-OH の生成量の変化

(平成 24 年 5 月 18 日受付, 平成 24 年 8 月 2 日再受付)

文 献

- (1) W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.", *Lebensm. Wiss Technol.*, 28, pp.25-30 (1995).
- (2) B. Ou, M. Hampsch-Woodill and R. L. Prior, "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.", *J. Agric. Food Chem.*, 49, pp.4619-4626 (2001).
- (3) R. Komatsu-Watanabe, Y. Sakurai, C. Morimoto, S. Sakamoto, K. Kanaori, and K. Tajima, "Quantitative Spin-trapping ESR Investigation on Reaction of Hydroxyl Radical and Selected Scavengers by a Newly Developed Flow-injection ESR System." *Chem. Lett.*, 37, pp.612-613 (2008).
- (4) 服部元, 牧村彩世, 畑光典, 武井安由知, 丹羽真清: "ESR スピントラップ法を用いた青果物における抗酸化力の測定", 第15回 ESR フォーラム研究会要旨集, pp.22-23 (2011).
- (5) 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).