

スピントラッピング ESR 法によるポリフェノール類と OH ラジカルの反応速度比の検討

○中川 清子^{*1)}、関口 正之^{*1)}

1. はじめに

生体内では、代謝の過程や紫外線の暴露などにより、OH ラジカルなどの活性酸素種が生成し、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。DMPO (5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキソド) などのスピントラップ剤で活性酸素種をトラップし、抗酸化物質の添加によるラジカル量の減少を ESR で測定する手法は、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、正確な評価法と期待されている。ESR による抗酸化能評価では一般的に、過酸化水素水を水銀ランプなどの紫外線で光分解して OH ラジカルを生成させる。しかし、ポリフェノール類などの抗酸化物質が 300 nm 以下の紫外線を吸収すると正確な評価ができない。そこで、300 ~ 400 nm の紫外線を選択的に照射した系を用いて、過酸化水素水および DMPO 濃度の最適条件を検討した。

2. 実験方法

DMPO と過酸化水素を含んだ水溶液と、抗酸化物質を溶解した水溶液を試料混合装置 (JEOL ES-SM2) で混合し、ESR キャビティにセットしたフラットセルに導入した。キセノンランプ (JEOL ES-UXL500, 25A) からの光を B-370 フィルタでフィルタリングし、300 ~ 400 nm の紫外線を選択的に照射した。10 分間照射した後、ESR スペクトロメータ (JEOL FA-200) で測定した。生成した DMPO-OH ラジカルの定量には、あらかじめ定量した Mn を用いた。

3. 結果・考察

過酸化水素濃度 1 mM、DMPO 濃度 200 ~ 500 μ M で、DMPO 濃度に関わらず 80 nM 程度の DMPO-OH ラジカルが生成し、ポリフェノール類の添加量の増加に伴って DMPO-OH の生成量が減少した。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 $[\text{DMPO-OH}]_0$ 、 $[\text{DMPO-OH}]_t$ とすると、

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

と表される。図 1 に、 $[\text{DMPO-OH}]_0/[\text{DMPO-OH}]_t$ を抗酸化物質と DMPO の濃度比に対してプロットした。図 1 の傾きから抗酸化物質の OH ラジカルとの反応速度比が得られ、パルスラジオリシス法で得られた反応速度定数の比とほぼ同様の傾向が認められた。

4. まとめ

過酸化水素の分解に 300 ~ 400 nm の紫外線を用いたスピントラッピング ESR 法において、パルスラジオリシス法と同等な精度で OH ラジカル消去能の評価が可能であることが分かった。

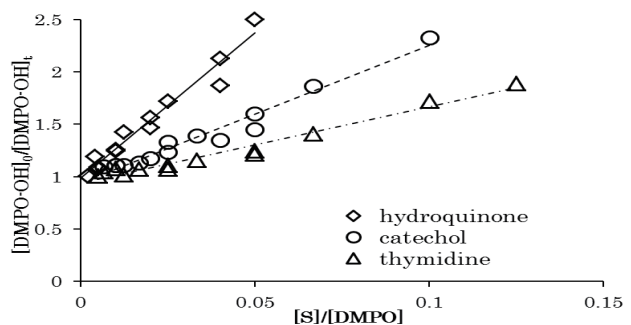


図 1. 抗酸化物質添加による DMPO-OH 生成の競争反応プロット

*1) バイオ応用技術グループ

H24.4~H25.3 【基盤研究】 ESR を利用した OH ラジカル消去能評価システムの開発