

一重項酸素(1O_2)に対する抗酸化能評価法

関連製品：電子スピン共鳴装置(ESR)

活性酸素種(ROS)の中でも、一重項酸素(1O_2)は反応性が極めて高いことが知られており、生体防御の観点から注目されています。図1に示したように、 1O_2 は分子軌道の電子スピンの反平行状態にありラジカルではありません。しかし、検出試薬;TMPDを使用すると、図2に示したように 1O_2 により酸化されTMPD \cdot が生成します。これをESRで測定することにより、間接的に 1O_2 をESRで評価できます。この反応はスピントラップではありませんが、TMPDを用いることで他のROSと同様のプロトコールで 1O_2 に対する抗酸化能を評価¹⁾することが可能です。以下で、ESRによる 1O_2 除去活性の評価を行う例をご紹介します。

1O_2 の生成試薬として、リボフラビン(Rf)を使用しました。図2に示したように、検出試薬TMPDと共に光照射(>400nm)すると、励起されたRfが溶存酸素(3O_2)を 1O_2 に変換します。これによりTMPDがTMPD \cdot に酸化されます。TMPD \cdot のESRスペクトルを図3に示しました。標準ラジカルとして多用されるTEMPOと比較すると、非常にシャープな信号を与えることが特徴です。3本の信号の内、最も低磁場側の信号強度を求めてTMPD \cdot 量の指標とします。

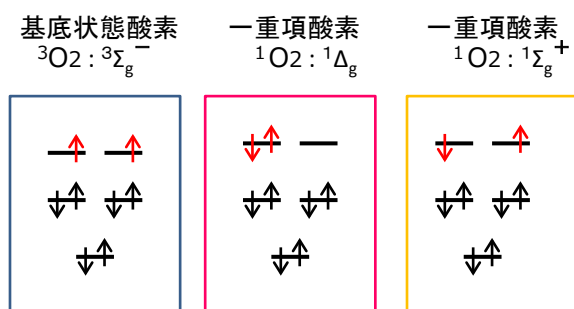


図1 酸素分子の2p軌道の電子配置²⁾

$^1\Sigma_g^+$ は溶液中で極めて不安定で直ちに $^1\Delta_g$ に変換するので、通常の化学反応に関与するのは $^1\Delta_g$ 酸素だけといわれる

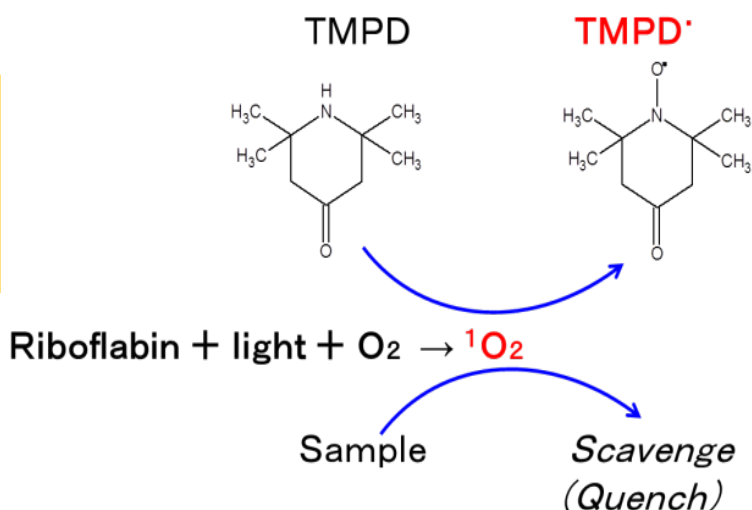
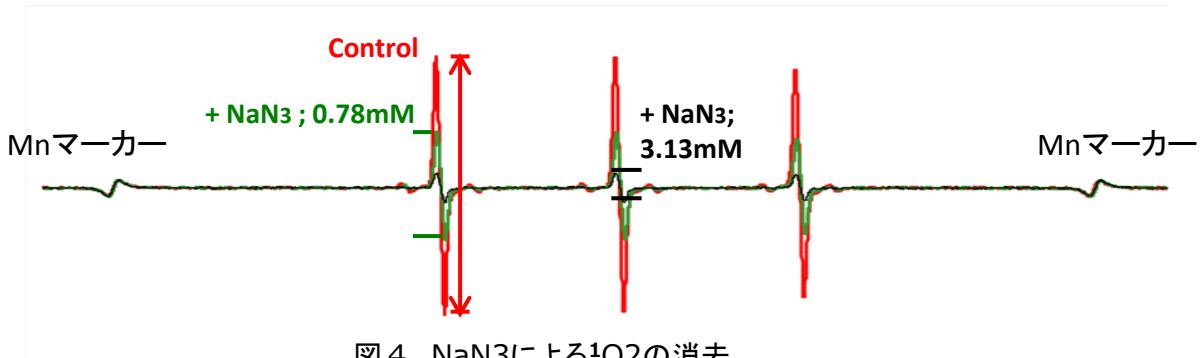


図2 1O_2 により生成するTMPD \cdot



図3 TMPD \cdot のESRスペクトル

$^1\text{O}_2$ 消去剤の一つとして知られる NaN_3 を標準物質³⁾として用い、無添加(Control)および異なる濃度(0.78mM, 3.13mM)の NaN_3 を添加した例を図4に示しました。 NaN_3 の用量依存的に信号が減少しました。これらの信号強度を計測して検量線を作成し、 $^1\text{O}_2$ の消去活性を求めることができます。活性値は、 NaN_3 濃度相当値として求めることができます。評価プロトコールを下に示しました。



評価系

| | | |
|--------------------------|------------------|------|
| Rf | : 200uM (buffer) | 50μl |
| TMPD | : 0.1M (buffer) | 50μl |
| DMSO | : 原液 | 75μl |
| NaN_3 or Sample | : 適宜bufferで希釈 | 25μl |

↓ 混合してセルに移す
15秒間 光照射
↓
ESR測定

図5に液体状食品の $^1\text{O}_2$ 消去能の例を示しました。いずれの試料も無作為に選択した銘柄の試料です。他のROSの消去能と同様に、原材料や製法により $^1\text{O}_2$ 消去能も異なるものと予想されます。

食品だけでなく化粧品やヘアケア製品等でも、 $^1\text{O}_2$ 消去能という機能性は注目されていますので、こうした製品の開発や評価にも有用と考えられます。

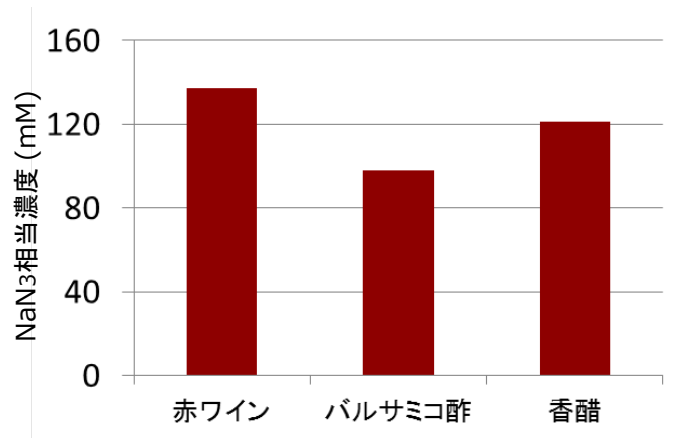


図5 $^1\text{O}_2$ 消去能の比較

参考資料

- 1) アプリケーションノート ER-070002
- 2) 活性酸素種の化学 季刊 化学総説 日本化学会編 No.7 1990 学会出版センター
- 3) 他にもヒスチジン、β-カロテン等が用いられます