

さらに高濃度側ではHTAのピーク面積に対する検量線が利用できる。

2. Fenton 反応により生じる水酸ラジカルのテレフタル酸を用いた定量

Fenton 反応は、様々な素反応が組み合わさった、複雑な反応であると理解されている。最初の反応は、過酸化水素が二価鉄によって1電子還元を受け、水酸ラジカルと水酸イオンとを生じることにより始まるとされる。Fenton 反応により生じる水酸ラジカルを定量した。

図-3に示すように、TAは過酸化水素だけではHTAを生じない。従って、ここで観察されたHTAはFenton 反応によって生じたOHラジカルを定量したことになる。

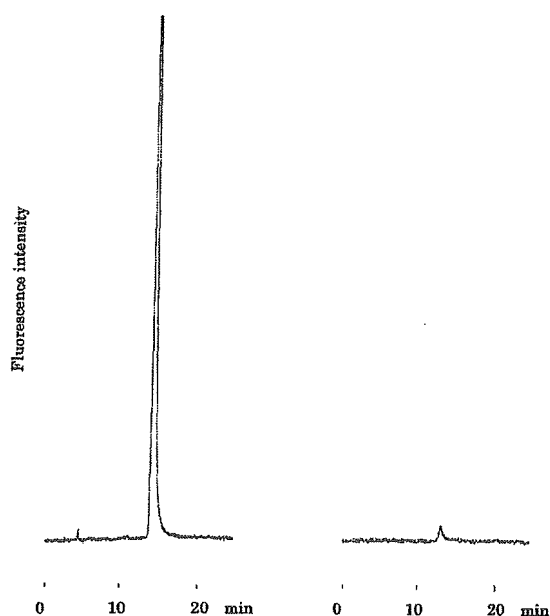


図-3 TAと過酸化水素との反応。TAは過酸化水素ではHTAを生成しない(右)。Fenton 反応で生成したOHラジカルを定量できる(左)。

終濃度 $50\mu\text{M}$ のFe(II)の存在下に、過酸化水素を加えて生じるHT

Aの量を測定すると、過酸化水素量がFe(II)の半分に等しくなるところ(加える H_2O_2 濃度で $500\mu\text{M}$)まで、ほぼ直線的にHTA生成量が増加し、そこでとまる。

従って、Fe(II)に対し、過酸化水素は、化学量論的に2:1で反応していると推定された。

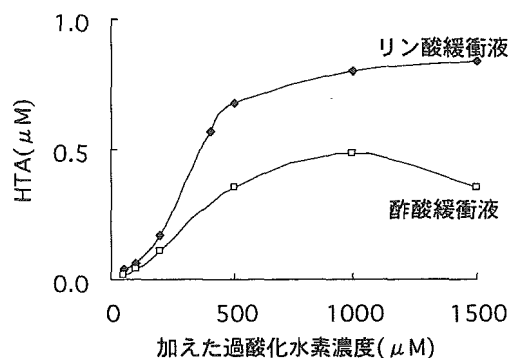


図-4 Fenton 反応の追跡

リン酸緩衝液(◆)と酢酸緩衝液(○)

酢酸緩衝液を用いると、酢酸が生成する水酸ラジカルを一部消去すると思われる、HTAの生成量は減り、過酸化水素濃度が高くなると、さらにHTA生成量の減少が認められた。

3. 化学発光検出法の検討

蛍光物質は、高励起状態の物質からエネルギーを受け取ることができれば、化学発光法により検出することが可能である。HTAを蛍光検出法よりもより高感度に検出できることを期待して、化学発光検出の可能性を検討した。

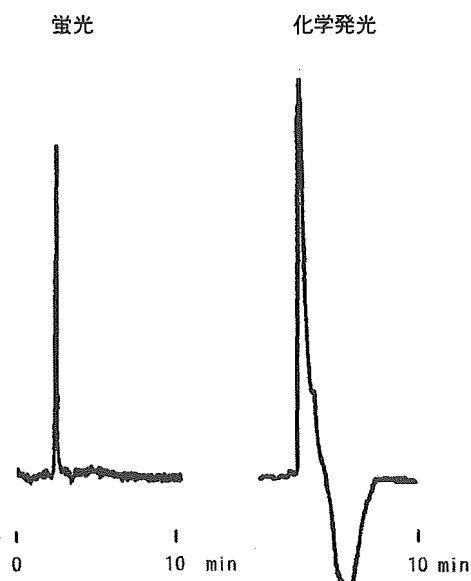
化学発光検出:

化学発光検出器として、ShodexCL2M(昭和電工)ならびに試薬送液ポンプとして880-PU(JASCO)を

用いた。HPLCの条件は上述した。ただし、この検討では、溶離液として、アセトニトリル：水（3：7）を用いた。

検出試薬は、1 mM TCPO（酢酸エチル：アセトニトリル＝1：3）を流速0.5 ml、で送液した。

結果：



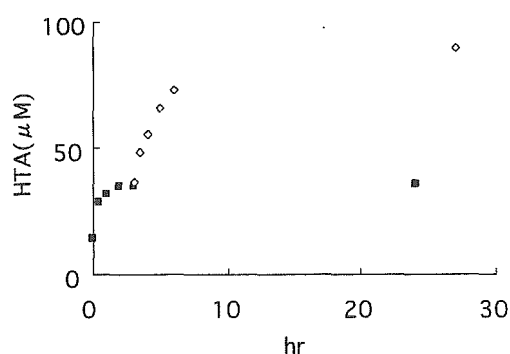
図－5 HTA (50 nM, 20 μ M) の化学発光検出

上図に示すように、化学発光法によって検出できることが明らかとなった。ベースラインが負になる現象が認められたが、これは溶離条件を最適化することで解消できると思われる。まだ、詳細な条件の検討を行っていないが、酸性溶離条件下では、DNPOのほうがTCPOよりもよいと思われ、現在、蓂酸誘導体、試薬の送液量、溶離液に添加する塩類の影響など鋭意検討中である。

4. 溶存酸素とFe(II)によるTAの水酸化反応について

昨年度の研究で、Fe(II)の存在下、過酸化水素がなくてもTAの水酸化反応が進行することを見出したが、この反応についてさらに検討した。

TAのFe(II)による水酸化反応を経時的に追跡すると図－6のように、およそ3時間後には反応が終了している。ここに新たに、Fe(II)溶液を添加すると、反応が再開し、再び止まる。これは、最初のFe(II)が溶存酸素により酸化される過程でTAの水酸化が起こっていることが推定されたので、実験に使用する水を脱気し、アルゴン置換したものを使用して、Fe(II)溶液ならびにTA溶液を調製し、混合すると、HTAの生成はほとんどないことが確かめられた(図－6)。これにより、昨年見出したTAのFe(II)による水酸化反応が、溶存酸素をFe(II)が還元して活性化し、生じた活性酸素種により進行していることが明らかとなった。現在、これが水酸ラジカルであるか、鉄の酸素錯体による酸化であるかを検証しようとしているところである。



図－6 Fe(II)と溶存酸素によるHTAの生成。3時間で終了した反応(●)は、新たなFe(II)の添加で再開される(□)。

E. 結論

テレフタル酸 (TA) の水酸化反応を利用して、蛍光検出による HPLC 定量法を確立した。本法は、TA の対称性から、従来のサリチル酸を用いる HPLC 法を凌ぐ方法であると考え。また、化学発光法による検出も可能であることを示した。今後は、水に紫外線を照射すると紫外線の影響が残るといふ報告があるので [2]、様々な系での水酸ラジカルの発生を検出するのに応用を試みたい。

[2] Alam, M. Z. B., Otaki, M., Furumai, H., Ohgaki, S., "Residual effect of UV-radiation: role of hydrogen-peroxide, metal and hydroxyl radical.", WEFTEC '99, Annu. Conf. Expo., 72nd (1999).

F. 研究発表

1. 論文発表

上記の研究内容は、現在投稿予定である (4 報目)。以下に、昨年度の報告以降、これまで発表した論文を記載する。

- 1) S. Sugata and Y. Abe, Computer Simulation of Hydrodynamic Models for Chemical/Pharmacokinetics. J. Chem. Software, 7, 79-85 (2001).
- 2) K. Hattori, R. Matsushita, K. Kimura, Y. Abe and E. Nakashima, Synergic Effect

of Indomethacin with Adriamycin and Cisplatin on Tumor Growth. Biol. Pharm. Bull., 24, 1214-1217, (2001).

- 3) Y. Abe, Shingo Yasuoka, Tomoko Shoji, Setsuro Sugata, Kenji Hattori, Kazunori Iwata and Hiroshi Suzuki, Peculiar Chiral Discrimination of Bovine Serum Albumin to (±)-N-Dansyl-norleucine. Anal. Sci., accepted.
- 4) Li Lin Xiang^a, Y. Abe, Y. Nagasawa, T. Shoji, T. Mashino, M. Mochizuki and N. Miyata, An HPLC Assay for Hydroxyl Radicals Formed in Fenton Reaction with Terephthalic acid. In preparation.

2. 学会発表

- 1) 阿部芳廣, 李 林香, 宮田直樹
「水酸ラジカルの HPLC による間接定量法について」
日本分析化学会第 50 年会 (熊本)
発表要旨集 p298、2001.11.
- 2) 李 林香、阿部芳廣、服部研之、
宮田直樹、鈴木廣志
「テレフタル酸の水酸化反応を利用した水酸ラジカルの定量 - Fenton 反応の追跡」
日本薬学会第 122 年会 (幕張)

2002. 3.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	頁	出版年
1) I. Nakanishi, <u>K. Fukuhara</u> , K. Okubo, T. Shimada, H. Kansui, M. Kurihara, S. Urano, S. Fukuzumi and <u>N. Miyata</u>	Superoxide Anion Generation via Electron-transfer Oxidation of Catechin Dianion by Molecular Oxygen in an Aprotic Medium	<i>Chem. Lett.</i>		1152-1153	2001
2) <u>K. Fukuhara</u> , M. Kurihara and <u>N. Miyata</u>	Photochemical Generation of Nitric Oxide from 6-Nitro- benzo[a]pyrene.	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	123	8662-8666	2001
3) A. Matsuoka, A. Furuta, M. Ozaki, <u>K. Fukuhara</u> and <u>N. Miyata</u>	Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromated exchanges in a Chinese hamste lung (CHL) cell line	<i>Mutation Research</i>	494	107-113	2001
4) I. Nakanishi, S. Fukuzumi, T. Konishi, K. Ohkubo, M. Fujitsuka, O. Ito and <u>N. Miyata</u>	DNA Cleavage via Superoxide Anion Formed in Photoinduced Electron Transfer from NADH to gamma-Cyclodextrin-Bicapped C60 in an Oxygen-Saturated Aqueous Solituion	<i>J. Pys. Chem. B</i>	106	2327-2380	2002
5) I. Nakanishi and <u>N. Miyata</u>	DNA Damage Caused by Photosensitizers	<i>Environ. Mutagen Res.</i>	23	57-63	2001
6) N. Sera, <u>K. Fukuhara</u> , <u>N. Miyata</u> and H. Tokiwa	Micronucleus induction and chromosomal aberration of 1- and 3-nitroazabenz[a]pyrene and their N-oxide	<i>Mutagenesis</i>	16	183-187	2001
7) I. Nakanishi, S. Fukuzumi, T. Konishi, K. Ohkubo, M. Fujitsuka, O. Ito and <u>N. Miyata</u>	DNA Cleavage via Electron Transfer from NADH to Molecular Oxygen Photoinduced by g-Cyclodextrin-Bicapped C ₆₀	<i>Fullerenes</i>	11	138-151	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	頁	出版年
8) K. Tanaka, T. Miura, N. Umezawa, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi and <u>T. Nagano</u>	Rational Design of Fluorescein-based Fluorescence Probes: Mechanism-based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	123	2530-2536	2001
9) H. Kojima, M. Hirotani, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi, Y. Hirata and <u>T. Nagano</u>	Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on Rhodamine Chromophore	<i>Analytical Chemistry</i>	73	1967-1973	2001
10) H. Kojima, M. Hirata, Y. Kudo, K. Kikuchi and <u>T. Nagano</u>	Visualization of Oxygen Concentration-dependent Production of Nitric Oxide in Rat Hippocampal Slices during Aglycemia	<i>J. Neurochem.</i>	76	1404-1410	2001
11) H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi and <u>T. Nagano</u>	Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer System with Coumarin Donor Included in beta-Cyclodextrin	<i>Analytical Chemistry</i>	73	939-942	2001
12) S. Sugata and <u>Y. Abe</u>	Computer Simulation of Hydrodynamic Models for Chemical/Pharmacokinetics.	<i>J. Chem. Software</i>	7	79-85	2001