

1A04 酵素触媒レドックスサイクリングを用いる OH ラジカルの高感度定量

(¹信州大理・²信州大若手拠点) おおさくなおや¹・○ 異^{たつみ} 広輔^{ひろすけ}²

名前には必ずふりがなを！

【緒言】活性酸素種のひとつである OH ラジカルは生体内で生成すると様々な生理作用を及ぼすことが知られている。OH ラジカルはきわめて短寿命であるが、これをアニリンまたはフェノール類でトラップし、生成した付加体を電気化学的に検出することにより、OH ラジカルの間接的な定量ができることが報告されている。しかしながら生体内での OH ラジカル濃度はきわめて低いため、より高感度な検出法が望まれている。そこで本研究では、酵素触媒レドックスサイクリングを用いることにより、OH ラジカルのトラップで生成した付加体の高感度検出を試みた。

【実験】OH ラジカルの生成およびトラップは、0.20–2.0 mM [Fe(II)EDTA]²⁻、0.20–2.0 mM フェノール、0.10 M グルコースを含むリン酸緩衝液(pH 7.0)中に 0.20–2.0 mM 過酸化水素を添加することにより行なった。生じた付加体 (カテコールおよびヒドロキノン) のボルタンメトリー応答を 10 U mL⁻¹ ピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQ-GDH)の添加前と添加後で比較した。作用電極として PFC 電極、参照電極として Ag/AgCl (0.1 M KCl)電極、対極として Pt コイルを用い、掃引速度 5 mV s⁻¹でサイクリックまたはリニアスイープボルタンメトリーを行なった。

【結果】図 1 に測定結果を示す。過酸化水素の添加前 (曲線 a) に酸化還元ピークは見られないが、添加後 (曲線 b) には 100 mV 付近にカテコールの生成にともなう小さい酸化還元ピークが観察された。そこへ PQQ-GDH を添加すると (曲線 c)、酸化電流の増幅が観察された。この電流は主として、カテコールの電気化学的酸化により生じた *o*-キノンがグルコースと PQQ-GDH の存在下で還元されてカテコールを再生したことによると考えられる。グルコースと PQQ-GDH を含む緩衝液中で検量線を得たところ、カテコールの検出下限は 8 nM であった。

フェノールで OH ラジカルをトラップした場合、カテコールだけでなくヒドロキノンも生成するため、付加体の正確な定量は困難である。パラ位に置換基を持つフェノール類を用いれば、ヒドロキノン型の付加体が生成せず、より正確な付加体の定量が期待される。講演ではその測定結果についても述べる予定である。

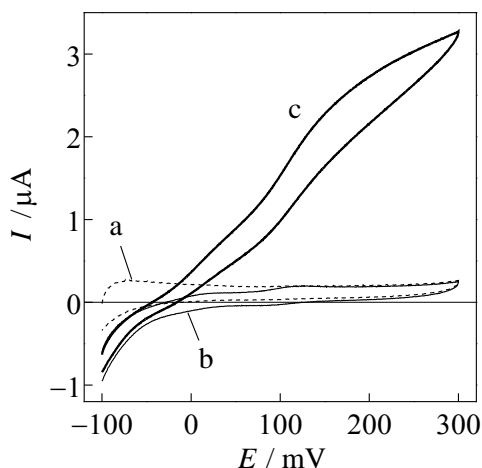


図 1. (a) 2.0 mM [Fe(II)EDTA]²⁻、2.0 mM フェノール、0.10 M グルコースを含むリン酸緩衝液(pH 7.0)のサイクリックボルタモグラム。掃引速度 5 mV s⁻¹。(b) (a)に 2.0 mM 過酸化水素を添加した後のボルタモグラム。(c) (b)に 10 U mL⁻¹ PQQ-GDH を添加した後のボルタモグラム。