

報 文

抗酸化物質の次亜塩素酸イオン消去能測定のためのシーケンシャルインジェクション-ルミノール化学発光分析法の開発

中村 訓子¹, 大庭 義史¹, 岸川 直哉¹, 黒田 直敬^{®1}

Measurement of antioxidative activity against hypochlorite ion by sequential injection analysis with luminol chemiluminescence detection

Kuniko NAKAMURA¹, Yoshihito OHBA¹, Naoya KISHIKAWA¹ and Naotaka KURODA¹

¹ Graduate School of Biomedical Sciences, Course of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521

(Received 6 May 2004, Accepted 7 July 2004)

A sequential injection analysis (SIA) with chemiluminescence detection for measuring the antioxidative activity against hypochlorite ion was developed. The antioxidative activity was expressed as the percentage inhibition of luminol chemiluminescence due to the scavenging of hypochlorite ion by an antioxidant. Using a 50 mM borate buffer (pH 9.5) as a carrier, the SIA system was optimized with respect to the reagent concentrations, volume and flow rates. The SIA system could measure 3 samples within 4 min. The relative standard deviations of the antioxidative activity for 2 nM ascorbic acid were 2.5% (within-day, $n = 3$) and 3.7% (between-day, $n = 3$). Several antioxidants, such as ascorbic acid, α -tocopherol and Trolox, were successfully measured by the SIA system, and the relationships between their antioxidative activity and the logarithm of concentrations of antioxidants were linear ($r = 0.983 - 0.999$). The proposed SIA system was rapid, sensitive and reproducible with minimum consumption of the reagents, and was thus useful for the rapid screening of antioxidants possessing antioxidative activity against hypochlorite ion.

Keywords : sequential injection analysis; hypochlorite ion; antioxidative activity; antioxidant; luminol chemiluminescence.

1 緒 言

生体内において、次亜塩素酸イオンは、好中球で産生されるミエロペルオキシダーゼ存在下、塩化物イオンと過酸化水素との反応により生成する¹⁾。次亜塩素酸イオンは、活性酸素種の中では生体内に比較的多量に存在する極めて強力な酸化剤であり、主として微生物に対する殺菌作用を担っている。しかしその一方で、各種疾患との関連についても報告されている²⁾。次亜塩素酸イオンは、低密度リポタンパク (low density lipoprotein, LDL) のバイオマーカーであるアポタンパク B-100 中のリジン残基を酸化し、ア

テローム性動脈硬化症を発生させる^{3)~6)}。また、潰瘍性大腸炎やクローン病の病変部においてマクロファージや好中球などの炎症性細胞から放出される次亜塩素酸イオンや過酸化水素などの活性酸素種は、炎症の進展と組織障害を引き起こす⁷⁾。既に、5-アミノサリチル酸が、それら活性酸素を消去することにより炎症の進展と組織の障害を抑制することが報告され、使用されている⁸⁾。このような理由から、次亜塩素酸イオンを消去する物質は、アテローム性動脈硬化症や炎症などの次亜塩素酸イオンの関与する疾患の治療及び予防において有用であると考えられ、次亜塩素酸イオン消去能を示す物質の迅速で簡便なスクリーニング及び評価法の開発が望まれている。

従来、次亜塩素酸イオンの消去能測定法として、ヒト血

¹ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科: 852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

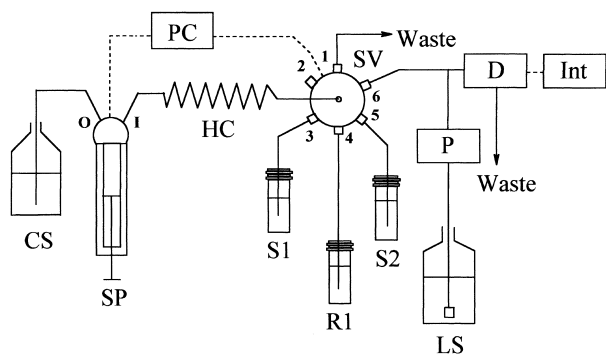


Fig. 1 SIA system for antioxidant assay of hypochlorite ion

SP: syringe pump; HC: holding coil (length: 1 m, 0.5 mm, i.d.); SV: selection valve; P: pump; D: chemiluminescence detector, Int: integrator; PC: personal computer; CS: carrier solution; RI: sodium hypochlorite solution; LS: luminol solution; S1: sample solution; S2: DMSO solution

清アルブミンと次亜塩素酸イオンを抗酸化物質の存在下反応させ、その反応生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動後のバンド強度として測定⁽⁹⁾¹⁰⁾、あるいはゲル浸透高速液体クロマトグラフィーによる分離後、フォトダイオードアレイ検出器で測定⁽¹⁰⁾することにより、消去能を算出する方法が報告されている。これらの方法は、抗酸化物質のスクリーニングに有用な方法であるが、測定時間が比較的長く操作も煩雑であるという欠点を有する。

次亜塩素酸イオンの消去能を簡便に測定することが可能な方法として、ルミノール化学発光を用いる方法が開発されており、フェノール類⁽¹¹⁾、フラバスタチン類⁽¹²⁾及びローズマリー抽出物⁽¹³⁾の抗酸化能測定に適用されている。この方法は、次亜塩素酸イオンとルミノールとの反応により生じる化学発光が、抗酸化物質による次亜塩素酸イオンの消去により減少することを利用して、この方法は高感度な方法であるが、バッチ法であるために操作が煩雑で人的負担が大きく、比較的少量の試薬及び試料を必要とするなどの欠点を有する。

近年、分析装置の小型化、分析の自動化に関する研究が盛んに行われており、1990年にRuzickaらによって報告されたシーケンシャルインジェクション分析 (sequential injection analysis, SIA) 法もそれらの一つである⁽¹⁴⁾。フローインジェクション分析 (flow injection analysis, FIA) 法の第二世代として開発されたSIAは、コンピュータで制御されるシリンジポンプ及びセレクションバルブを用いて、試料溶液と試薬溶液を順次ホールディングコイル内に注入し、混合を行い、反応生成物を検出器へ導き測定を行う方法である⁽¹⁵⁾¹⁶⁾。従来のFIA法に比べ、試薬溶液を連続的に送液する必要がないため試薬消費量が少なく、操作の

Table 1 Time program for antioxidant assay of hypochlorite ion by SIA

Unit	Command	Flow rate/ ml min ⁻¹	Volume/ μl
Syringe pump	Set position O		
Syringe pump	Aspirate	1.5	600
Syringe pump	Set position I		
Valve selection	Set position 4		
Syringe pump	Aspirate	0.4	20
Valve selection	Set position 3 (sample) or Set position 5 (blank)		
Syringe pump	Aspirate	0.4	5
Valve selection	Set position 6		
Syringe pump	Excrete	0.8	625

自動化による人的負担の軽減、再現性の向上も期待できる分析法である。

本研究では、迅速かつ簡便な次亜塩素酸イオン消去能測定を目的に、ルミノール化学発光に基づくSIA法の開発を行った。また、構築したSIAシステムを抗酸化物質の測定へ適用し、従来のバッチ法^(11)~13)との比較を行った。

2 実 験

2.1 装 置

本研究で用いたSIAシステムの概略図をFig. 1に示す。SIA装置には、シリンジポンプ: Cavro XL 3000, 試薬送液ポンプ: Shimadzu LC-10AD vp, セレクションバルブ: Cavro Smart Valve, 化学発光検出器: Shimadzu CLD-10A, インテグレーター: Shimadzu Chromatopac C-R8Aを用いた。また、ホールディングコイルには、テフロンチューブ (内径0.5 mm, 長さ1 m) を使用した。

2.2 試 薬

ホウ酸、次亜塩素酸ナトリウム溶液、L-アスコルビン酸は和光純薬、水酸化ナトリウムはMerck, ルミノールはSigma, α -トコフェロールはナカライ, トロロックスはAldrich, ジメチルスルホキシド (DMSO) は同仁化学より購入した。

100 μ M 次亜塩素酸ナトリウム溶液: 次亜塩素酸ナトリウム溶液を50 mM ホウ酸塩緩衝液 (pH 9.5) で希釈し、調製した。

200 μ M ルミノール溶液: ルミノール (ナトリウム塩) 7.96 mg を、水 200 ml に溶解して調製した。

2.3 測定条件

Table 1に本SIA法のタイムプログラムを示す。キャリアー溶液として50 mM ホウ酸塩緩衝液 (pH 9.5) 600 μ l をシリンジに吸引する。次に100 μ M 次亜塩素酸ナトリウ

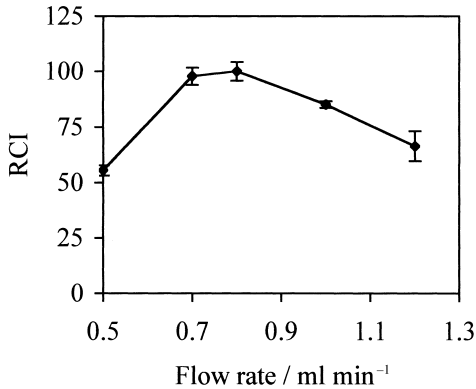


Fig. 2 Effects of flow rate of carrier solution on chemiluminescence intensity

ム溶液 (ポート 4) 20 μ l, 試料の DMSO 溶液 (ポート 3) あるいは空試験として DMSO (ポート 5) 5 μ l を順次ホールディングコイル内に吸引する. セレクションバルブのポートを 6 に切り替え, シリンジ内のキャリアー溶液を排出する. 反応混液を 200 μ M ルミノール溶液 (流量: 1.0 ml/min) の流れの中に注入し, 生じる化学発光に基づくピーク高さを測定する.

次亜塩素酸イオン消去能は, 以下の式により算出する.

$$\text{次亜塩素酸イオン消去能 (\%)} = \frac{\text{CLI}_B - \text{CLI}_S}{\text{CLI}_B} \times 100$$

CLI_B, CLI_S はそれぞれ空試験, 試料測定により得られる化学発光強度を表す.

3 結果及び考察

3.1 測定条件の最適化

試料溶液量を 5 μ l に固定し, キャリヤー溶液の流量, 次亜塩素酸ナトリウム溶液の濃度及び吸引体積を検討した. また, 発光強度に影響を与えるルミノール溶液についても最適化を行った. 測定条件の最適化は, 抗酸化物質を含まない DMSO (空試験) を用いて得られる化学発光強度を指標に用いた. 測定値は, 3 回繰り返し測定を行った平均 \pm 標準偏差で示した.

3.1.1 キャリヤー溶液の流量 キャリヤー溶液として用いる 50 mM ホウ酸塩緩衝液 (pH 9.5) の排出流量について最適化を行った (Fig. 2). 流量を 0.5~1.2 ml/min の範囲で検討を行ったところ, 流量 0.7~0.8 ml/min において最大の発光強度が得られた. したがって, キャリヤーの流量は 0.8 ml/min を用いた.

3.1.2 ルミノール溶液の濃度及び流量 化学発光試薬であるルミノール溶液の濃度及び流量について最適化を行った (Fig. 3).

ルミノール濃度を 100~300 μ M の範囲で検討を行った

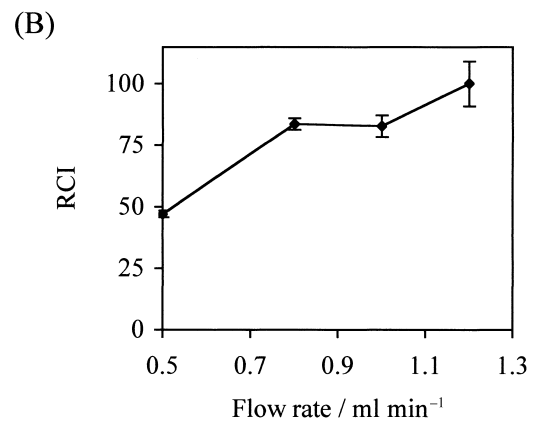
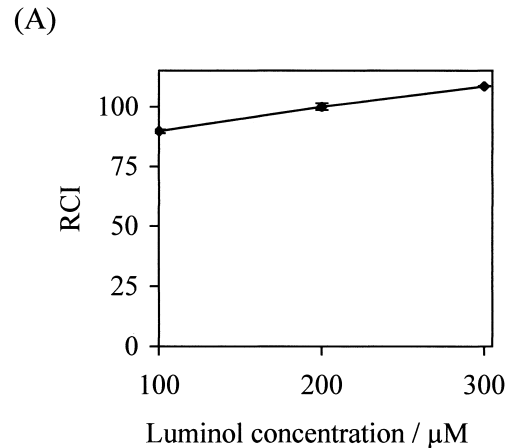


Fig. 3 Effects of (A) concentration and (B) flow rate of luminol solution on chemiluminescence intensity

ところ, ルミノール濃度に依存して化学発光強度がわずかに上昇した {Fig. 3(A)}. ここでは, 200 μ M ルミノール溶液を用いた. ルミノール溶液の流量を 0.5~1.2 ml/min の範囲で検討を行った {Fig. 3(B)}. 流量の増加に伴い化学発光強度も大きくなったが, 繰り返し測定における精度が低下した. よって, 流量は 1.0 ml/min を選択した.

3.1.3 次亜塩素酸ナトリウム溶液の濃度及び吸引体積 次亜塩素酸ナトリウム溶液の濃度及び吸引体積について最適化を行った (Fig. 4).

次亜塩素酸ナトリウム濃度 50~200 μ M の範囲内で最適条件を調べたところ, 次亜塩素酸ナトリウムの濃度に依存して化学発光強度も上昇したが, 繰り返し測定における精度の低下がみられた {Fig. 4(A)}. ここでは 100 μ M を採用した.

100 μ M 次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて, その吸引体積が化学発光強度に与える影響について検討を行った {Fig. 4(B)}. 検討した範囲 15~30 μ l で, 次亜塩素酸ナトリウム溶液の吸引体積に比例した化学発光強度の上昇が観察された. ここでは 20 μ l を選択した.

3・2 シグナルレスポンス

構築した最適測定条件を用いて、L-アスコルビン酸（ビタミン C, 20 nM～200 μM）の次亜塩素酸イオン消去能測定を行った際のシグナルレスポンスを Fig. 5 に示す。シグナルレスポンスは、L-アスコルビン酸の濃度に依存して減少した。本 SIA 法は、4 分以内で 3 検体の次亜塩素酸イオン消去能測定が可能であった。

3・3 精度

構築した SIA 法の日内及び日間における測定精度 ($n = 3$) を、2 nM L-アスコルビン酸を試料として用いて調べた

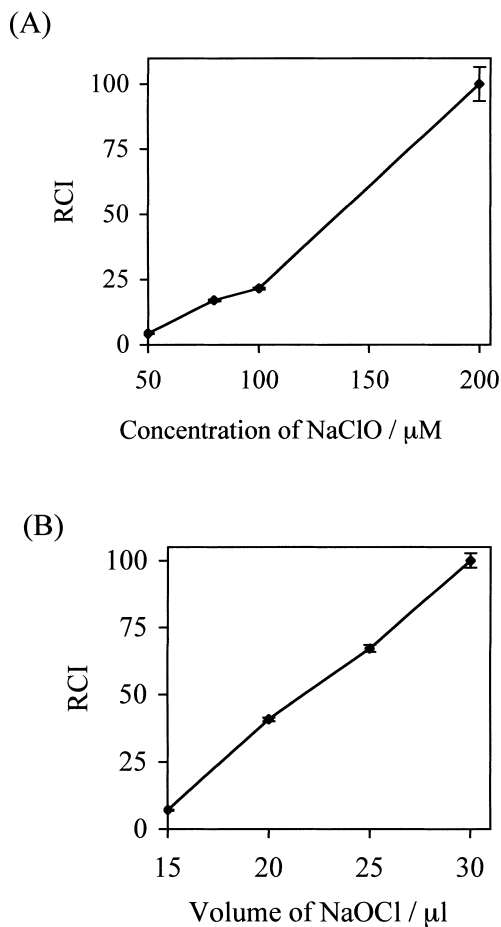


Fig. 4 Effects of (A) concentration and (B) volume of sodium hypochlorite solution on chemiluminescence intensity

(Table 2). 日内及び日間の精度は、相対標準偏差 (R.S.D.) でそれぞれ 2.5%, 3.8% と良好であった。

3・4 抗酸化物質の次亜塩素酸イオン消去能測定

確立した最適条件に従い、ビタミン類である L-アスコルビン酸、 α -トコフェロール（ビタミン E）及び水溶性の α -トコフェロール誘導体であるトロロックス (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) の次亜塩素酸イオン消去能測定を行った (Table 3). 3 種の抗酸化物質の次亜塩素酸イオン消去能は、抗酸化物質の濃度の増加に伴い増加し、 α -トコフェロール < L-アスコルビン酸 < トロロックスの順に強い次亜塩素酸イオン消去能がみられた。3 種の抗酸化物質の次亜塩素酸イオンに対する IC_{50} 値 (各試料が空試験の 50% の発光強度を与える濃度) を算出するため、3 種の抗酸化物質の濃度 (L-アスコルビン酸: 20 nM～200 μM, α -トコフェロール: 1 μM～1 mM, トロロックス: 0.6 nM～20 nM) と次亜塩素酸イオン消去能との関係式を作成した。その結果、抗酸化物質濃度の対数と次亜塩素酸イオン消去能は、直線性 ($r = 0.983 - 0.999$) を示し、 IC_{50} 値はそれぞれ、L-アスコルビン酸: 4.8×10^{-6} M, α -トコフェロール: 4.8×10^{-4} M, トロロックス: 5.4×10^{-9} M であった。

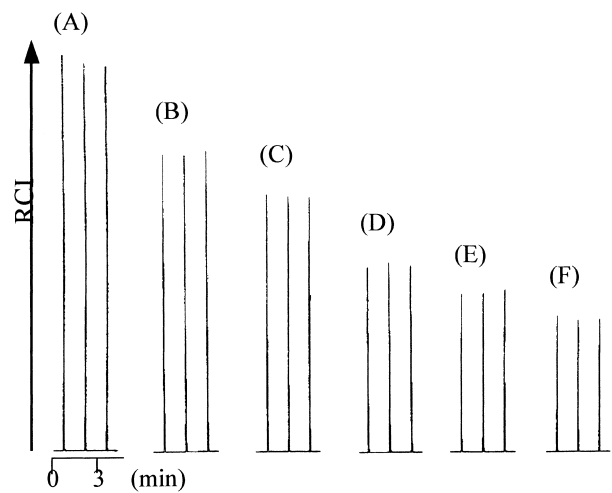


Fig. 5 Signal responses for (A) blank, (B) 20 nM, (C) 200 nM, (D) 2 μM, (E) 20 μM and (F) 200 μM L-ascorbic acid

Table 2 Reproducibility of antioxidative activity of L-ascorbic acid against hypochlorite ion

	Antioxidative activity, %			Average	S.D. ^{a)}	R.S.D., %
	1	2	3			
Within-day ($n = 3$)	13.37	13.28	12.75	13.13	0.33	2.5
Between-day ($n = 3$)	12.17	13.13	12.71	12.67	0.48	3.8

Sample: 2 nM L-ascorbic acid; a) S.D.: standard deviation

Table 3 Equations and IC₅₀ values for L-ascorbic acid, α-tocopherol and Trolox against hypochlorite ion

Antioxidant	Equation ^{a)}	r	IC ₅₀ /M
L-ascorbic acid	y = 11.2 log (x) + 110	0.983	4.8 × 10 ⁻⁶
α-tocopherol	y = 6.30 log (x) + 70.9	0.983	4.8 × 10 ⁻⁴
Trolox	y = 14.0 log (x) + 166	0.999	5.4 × 10 ⁻⁹

a) y = antioxidative activity, x = antioxidant concentration (M)

Table 4 IC₅₀ values for antioxidants obtained by SIA and batch methods

Antioxidant	SIA method	Batch method
	IC ₅₀ /M	IC ₅₀ /M
L-ascorbic acid	4.8 × 10 ⁻⁶	2.0 × 10 ⁻³
α-tocopherol	4.8 × 10 ⁻⁴	2.2 × 10 ⁻²
Trolox	5.4 × 10 ⁻⁹	4.2 × 10 ⁻⁴

3・5 従来法との比較

今回構築した SIA 法と、従来法であるバッチ法^{11)~13)}との比較を行った。

Table 4 に、バッチ法及び SIA 法における L-アスコルビン酸、α-トコフェロール及びトロロックスの IC₅₀ 値を示す。SIA 法及びバッチ法により得られた IC₅₀ 値はいずれも、α-トコフェロール > L-アスコルビン酸 > トロロックスの順に減少した。また、SIA 法により得られた IC₅₀ 値は、バッチ法により得られた IC₅₀ 値の 10⁻⁵ ~ 10⁻² 倍であった。

SIA 法とバッチ法による試薬消費量と測定時間の比較を Table 5 に示す。SIA 法の試薬消費量はバッチ法の約 0.17 ~ 0.62 倍であり、測定時間は約 0.14 倍であった。更に、バッチ法での試料濃度は mM レベルであったが、SIA 法では nM ~ μM レベルの広い濃度範囲で測定できるという利点を有していた。

4 結 語

SIA-ルミノール化学発光法による抗酸化物質の次亜塩素酸イオン消去能測定法を開発した。確立した最適条件下、抗酸化物質の次亜塩素酸イオン消去能測定が、簡便かつ高精度で、しかも少ない試薬消費量で可能であった。今後、スーパーオキシドアニオンや一重項酸素等の他の活性酸素種消去能測定の SIA 化を試みていく予定である。

Table 5 Comparison between SIA and batch methods on consumption of reagents and measuring time

	luminol	NaOCl
SIA method		
concentration/μM	200	100
volume/μl	1500	20
amount/mol	3.0 × 10 ⁻⁷	2.0 × 10 ⁻⁹
measuring time/min	1.5	
Batch method		
concentration/μM	530	40
volume/μl	900	300
amount/mol	4.8 × 10 ⁻⁷	1.2 × 10 ⁻⁸
measuring time/min	11	

文 献

- 1) J. E. Harrison, J. Schultz: *J. Biol. Chem.*, **251**, 1371 (1976).
- 2) S. Dukan, S. Belkin, D. Touati: *Arch. Biochem. Biophys.*, **367**, 311 (1999).
- 3) D. Lapenna, F. Cuccurullo: *Gen. Pharmacol.*, **27**, 1145 (1996).
- 4) E. A. Podrez, H. M. Abu-Soud, S. L. Hazen: *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1717 (2000).
- 5) J. W. Heinecke: *Am. J. Cardiol.*, **91**, 12 (2003).
- 6) L. J. Hazell, G. Baerenthaler, R. Stocker: *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1254 (2001).
- 7) H. Allgayer: *Klin. Wochenschr.*, **69**, 1001 (1991).
- 8) 中丸幸一, 菅井利寿, 木下宣祐, 佐藤雅子, 谷口偉, 川瀬重雄: 日本薬理学会雑誌, **104**, 447 (1994).
- 9) E. Grippa, F. Pavone, M. T. Gatto, R. Petrucci, G. Marrosu, B. Silvestrini, L. Saso: *Biochim. Biophys. Acta*, **1524**, 171 (2000).
- 10) M. T. Gatto, O. Firuzi, R. Agostino, E. Grippa, A. Borsò, F. Spinelli, L. Pavan, M. Petrolati, R. Petrucci, G. Marrosu, L. Saso: *Biomed. Chromatogr.*, **16**, 404 (2002).
- 11) O. Cynshi, Y. Takashima, Y. Katoh, K. Tamura: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **10**, 261 (1995).
- 12) A. Nakashima, M. Ohtawa, K. Iwasaki, M. Wada, N. Kuroda, K. Nakashima: *Life Sci.*, **69**, 1381 (2001).
- 13) M. Wada, H. Kido, K. Ohyama, N. Nakashima, Y. Ohba, N. Kuroda, K. Nakashima: *Food Chem.*, **87**, 261 (2004).
- 14) J. Ruzicka, G. D. Marshall: *Anal. Chim. Acta*, **237**, 329 (1990).
- 15) H. Paseková, M. Polásek, J. F. Cigarro, J. Dolejšová: *Anal. Chim. Acta*, **438**, 165 (2001).
- 16) C.-H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, B. Zamost: *Analyst*, **126**, 291 (2001).

要 旨

ルミノール化学発光を用いた、抗酸化物質の次亜塩素酸イオン消去能測定のためのシーケンシャルインジェクション分析 (sequential injection analysis, SIA) 法を開発した。同消去能は、抗酸化物質の次亜塩素酸イオン消去により減少するルミノール化学発光の減少率により算出した。50 mM ホウ酸塩緩衝液 (pH 9.5) をキャリアーに用い、試薬濃度、流量、試薬体積等について最適化を行った。本 SIA 法により L-アスコルビン酸、 α -トコフェロール及びビトロックスの次亜塩素酸イオン消去能測定に応用した。構築した SIA 法は、3 検体当たり 4 分以内で測定可能であり、2 nM L-アスコルビン酸の消去能測定における相対標準偏差は、日内で 2.5%、日間で 3.8% と良好であった ($n = 3$)。本法は迅速、高感度かつ高精度であり、測定時間及び試薬消費量も従来のバッチ法に比べ大幅に減少した。本 SIA 法は、次亜塩素酸イオン消去能を有する抗酸化物質の迅速なスクリーニングに有用である。