



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	パルスラジオリシス法によるスーパーオキシドとニトロブルーテトラゾリウムの反応について
Author(s)	高橋, 憲司; 白, 時森; 澤村, 貞史 他
Citation	北海道大學工學部研究報告, 160, 39-48
Issue Date	1992-07-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42314
Type	departmental bulletin paper
File Information	160_39-48.pdf



パルスラジオリシス法によるスーパーオキシドと ニトロブルーテトラゾリウムの反応について

高橋憲司* 白 時森* 澤村貞史** 北市雅敏*** 片山明石*

(平成4年3月19日受理)

A Study on Reaction between Superoxide and Nitro Blue Tetrazolium by the Pulse Radiolysis Methode

Kenji TAKAHASHI, Bai Shyu-Shen, Sadashi SAWAMURA,
Masatoshi KITAICHI and Meiseki KATAYAMA

(Received March 19, 1992)

Abstract

Pulse Radiolysis studies of the reaction between Superoxide anion radicals (O_2^-) and Nitro Blue Tetrazolium (NBT) were performed by an improved Pulse Radiolysis equipment.

A reaction mechanism between O_2^- and NBT was proposed based on the experimental results of transient absorption spectra.

The absorption observed immediately after the pulse at 420nm was attributed to the Tetrazolynyl radical, which was produced rapidly by one electron transfer from O_2^- to NBT.

The Tetrazolynyl radicals were changed to Monofolmazan by one electron reduction.

Finally, Blue Folmazan was produced from NBT.

1. 緒 言

Fridovichらが1960年にスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) と特異的に反応するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を発見して以来、 O_2^- の反応性が注目されてきた¹⁾。基底状態の酸素分子に比べ反応性の高い O_2^- がキサンチン酸化酵素の触媒作用により生成され、細胞成分を酸化し酸素障害を引き起こすということが注目された主な理由であるが、生体系での反応に限らず興味ある点が多い。 O_2^- は電子受容体あるいは電子供与体として働き、その反応の基本は電子移動反応である。電子移動のメカニズムやダイナミクスの理解は、多くの反応機構の解明に不可欠であり、有機伝導材料、情報変換材料、電子や正孔の分離および輸送、分子素子の開発などに関連し活発に研究が進められている²⁾。電子移動により生成あるいは消滅するラジカルイオン中間体の研究、特に高時間分解能が要求される場合の研究手法としてパルスラジオリシス法、レーザー閃光光分解法が用いられてきた。これらは、単に短寿命化学種の動力学を研究するためのみならず、反応系に対するエネルギー供給手段としても他にはない優れた特徴を有している。本研究で対象とした O_2^- を

* 原子工学科 放射体応用学講座

** 瞬間強力パルス状放射線発生装置研究室

*** 直線型加速器研究室

生成する方法として、酵素法、電解法などがあるが、高濃度でしかも純粋に O_2 を生成する方法としてパルスラジオリシス法は優れた方法である。本研究では、水和電子およびヒドロキシルラジカルを利用したスーパーオキシドアニオンラジカル $O_2^{\cdot -}$ の生成および $O_2^{\cdot -}$ からの電子移動により還元されブルーホルマザンを生成するといわれている色素、NBT (Nitro Blue Tetrazolium) との反応機構などについて検討する。

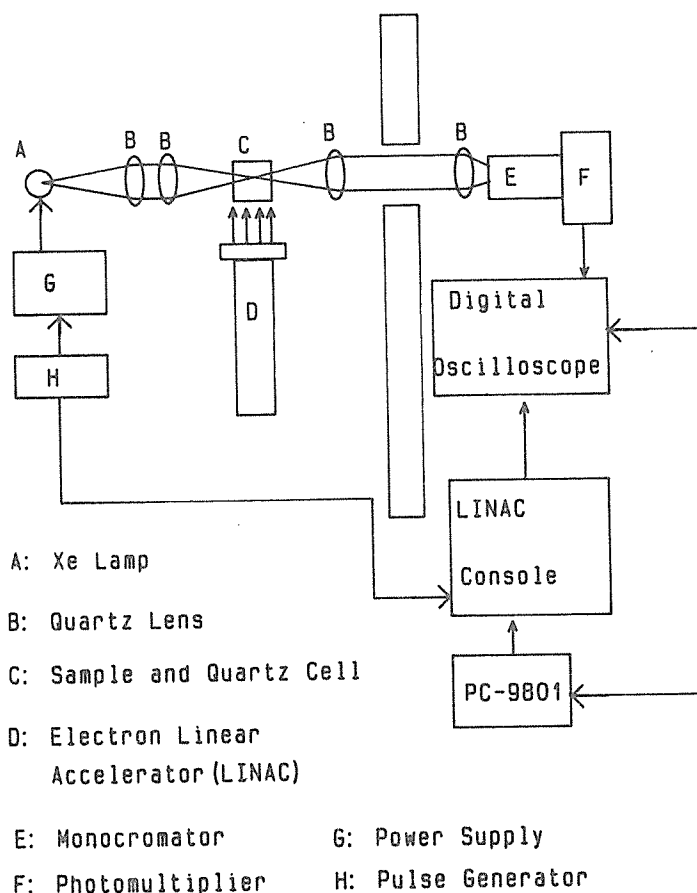


Fig. 1 Schematic diagram of Pulse Radiolysis system on 45MeV LINAC

2. 実験装置と方法

本研究ではマイクロ秒領域及びナノ秒領域の時間分解能のパルスラジオリシス法により実験を行った。時間分解能は加速器から出る電子線パルスのパルス幅に依存する。マイクロ秒のパルスラジオリシスには北大工学部の4 MeV直線加速器 (パルス幅 $1.6\mu s$) を、ナノ秒のパルスラジオリシスには45MeV直線加速器 (最小パルス幅10ns) を放射線源として使用した。本実験で用いたナノ秒領域のパルスラジオリシス装置の概略図をFig. 1 に示した。

石英セルに入れた試料に加速器からのパルス状電子線を照射し、引き続き生成したラジカルや活性種の生成減衰を、化学種の光吸収の変化を追跡することにより観測できるよう

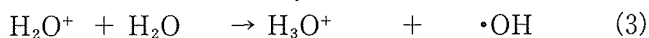
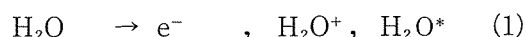
設計されている。Xeランプからの分析光を石英レンズで集光して試料の側面に当てる。試料を通過した分析光はモノクロメーターへ導かれ、光電子増倍管で検出される。光電子増倍管からの信号は、デジタルストレージオシロスコープにより測定される。本実験では、 O_2^- の直接観測が一つの目的であるが、 O_2^- の吸収極大は250–260nmに、分子吸光係数は1500–2600 $M^{-1}cm^{-1}$ の間にあるとの報告がある³⁾。そのような波長領域はこれまで用いられてきたパルスラジオリシス体系では測定が不可能であった。しかし、北大工学部瞬間強力パルス状放射線発生装置研究室スタッフなどの協力により、短波長領域の測定を可能とする改良が行われ、およそ200nmまでの測定が可能となった。体系の改良箇所については秋山ら⁴⁾が報告しているが、主な改良点を述べると、光電子増倍管からコンピュータへの約60mにおよぶデータ転送を光ファイバーによるデータ転送としたこと、Xeランプを定常点灯からパルス点灯へ変更したことである。また、電子線パルスと分析光パルスとのタイミングを調節する工夫がなされている。

試料が吸収した放射線のエネルギーの測定には、化学的線量測定法を用いた。すなわち、チオシアン酸カリウム水溶液に放射線を照射した際に生じる中間体 $(SCN)_2^-$ の光吸収を利用して線量測定を行った。本実験での吸収線量は約7 krad–10kradの範囲であった。用いた試薬はNBT (生化学用, 和光純薬), Superoxide Dismutase, from Bovine Erythrocyte (生化学用, 和光純薬), ギ酸ナトリウム (和光純薬), Nitro Blue Diformazan (Sigma社) である。実験は室温にて行い、試料の作成には三回蒸留水を用いた。

3. 実験結果と考察

3-1 水中での O_2^- の生成

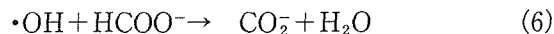
O_2^- の生成には、水に電子線を照射した際に生成される主な活性種である水和電子 e_{aq}^- 及びヒドロキシルラジカル $\cdot OH$ を有効に使うことができる。水に電子線を照射すると水分子のイオン化と励起が生じる。イオン化により二次的に生成された電子は他の水分子をもイオン化、励起するが衝突する間にエネルギーを失い、周りに水和層を形成して水和電子となる。一方、励起された水分子は解離してH原子とOHラジカルになる。



これら活性種は、初めは空間的に不均一に分布しているが、拡散によって均一な分布へと移行する。水中に酸素を溶存させておくと、水和電子は酸素分子と極めて速く反応してスーパーオキシドアニオンラジカル O_2^- を生成する。



また、ギ酸を共存させておくと、ヒドロキシルラジカルからも次のように O_2^- を生成することができる。



以上の反応式から分かるように、 O_2^- の生成する量は電子線照射により初期に生成された水和電子とヒドロキシルラジカルの量を用いて表すことができる。つまり、放射線100eV当たりのエネルギーを吸収した際に生成される分子あるいは原子の個数を表すG値を用いると、生成する O_2^- の量は、

$$G(\text{O}_2^-) = G(e_{\text{aq}}^-) + G(\cdot\text{OH}) \quad (8)$$

ここで、水和電子のG値を $G(e_{\text{aq}}^-)$ 、ヒドロキシルラジカルのG値を $G(\cdot\text{OH})$ とした。 $G(e_{\text{aq}}^-)$ および $G(\cdot\text{OH})$ に関して報告されている中性の水における既往の研究結果⁵⁾を用いると $G(\text{O}_2^-) = 5.3$ となる。本実験における吸収線量は7-10kradであるので生成される O_2^- の濃度は計算の上では $3.8-5.5 \times 10^{-5} \text{M}$ となる。

酸素飽和し、pH8.4に調節された0.2Mのギ酸ナトリウム水溶液を用いて、波長250nmにおいて観測された吸光度の時間変化をFig. 2に実線aとして示した。

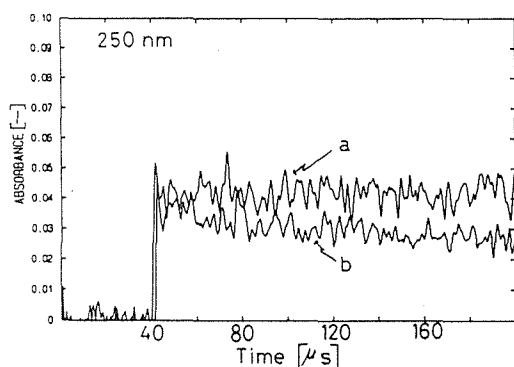


Fig. 2 Change of absorption due to electron pulse in oxygenated 0.2M HCOONa solution.
a: without SOD, b: with SOD

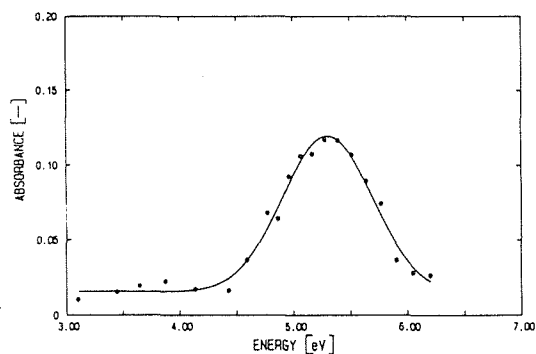


Fig. 3 Absorption spectra observed at 10 μs after the pulse.

電子線照射後の吸光度の急激な立ち上がりより、 O_2^- の生成は極めて短時間の内に完了していると考えられる。その後の吸光度はほとんど変化していないが、次式で表されるアルカリ性領域での O_2^- 自身の失活が比較的遅いことと対応しているであろう。



また、Fig. 2の実線bに示したのは、 O_2^- と特異的に反応して O_2^- を不均化するSODを含む酸素飽和した0.2Mギ酸ナトリウム水溶液で得られた吸光度の時間変化である。SODを含まない場合と比較して吸光度はしだいに減少しており、Eqs. (5) - (7)にしたがって O_2^- が生成され、その後SODの作用による次式の不均化反応を経て O_2^- が消滅したものと考えられる。

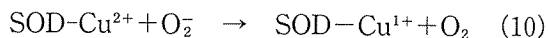


Fig. 3 に示したのは、本実験で得られた O_2^- の吸収スペクトルである。吸収光の波長をエネルギーに変換してプロットしてある。

3-2 NBTと O_2^- との反応

スーパーオキシドアニオンラジカル O_2^- は種々の反応を起こすことが知られている。それらは、求核置換反応、求核付加反応、水素引き抜き反応、1電子還元反応、1電子酸化反応などである。 O_2^- とニトロブルーテトラゾリウム(NBT)との反応は還元反応で、NBTは O_2^- と反応して、530nm (分子吸光係数 $3600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)に吸収極大をもつブルーホルマゼンを生成するといわれている。本反応系において、目的とするNBTと O_2^- との反応が生じているかどうか確認する実験をいくつか行った。

Fig. 4 に 10^{-4}M のNBTを含む酸素飽和した 0.2M ギ酸ナトリウム水溶液を用い、マイクロ秒領域のパルスラジオリシス法により得られた吸光度の時間変化を示した。波長420nmにおいて観測された吸光度の変化は、パルス照射後急激に立ち上がりその後時間の経過と共に減衰するが、パルス照射後およそ $160\mu\text{s}$ においても吸光度はゼロにならない。一方、波長540nmにおいて観測された吸光度はしだいに増加し、その後一定値に漸近する。また、420nm及び540nmにおける吸光度の時間変化を、擬1次反応と仮定して整理すると、両者の速度はほぼ一致する。つまり、420nmに吸収をもつ中間体を経て540nmに吸収をもつ物質へと変化していることが予想される。

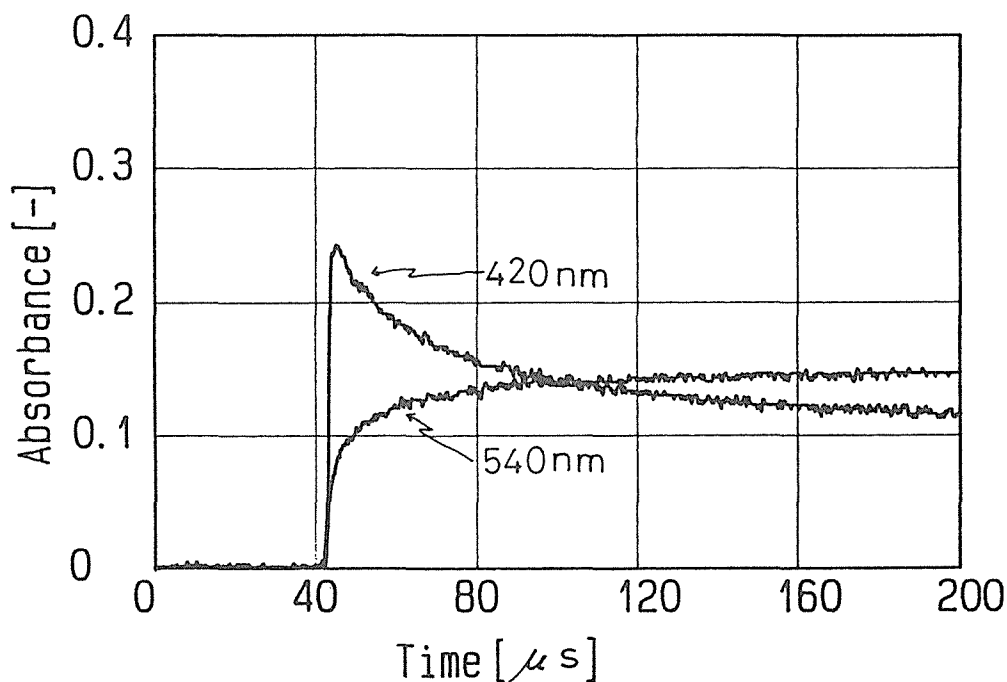


Fig. 4 Kinetic traces observed in pulse irradiated oxygen-saturated 0.2M HCOONa solution including 10^{-4}M NBT at 420nm and 540nm.

凝縮相における放射線化学特有のモデルとして、電子線の飛跡に沿って生じるラジカルイオン種の分布を表すSpur Modelがある⁶⁾。電子線の飛跡に沿って互いに接近して生じた初期ラジカル、 e_{aq}^- 、 $\cdot OH$ などは再結合などの反応を行うが、それら初期ラジカルと反応する捕捉剤を添加しておく、捕捉剤はSpur中にはいり込んで、初期ラジカル同士の再結合などの反応と競合し、初期ラジカルと捕捉剤との反応によるラジカル生成物の量が増大する。このような添加物の効果は捕捉剤効果として検討されている。Eq. (6)に示した反応はヒドロキシルラジカルの捕捉反応である。この場合、 $HCOO^-$ が $\cdot OH$ の捕捉剤として作用する。捕捉剤 $HCOO^-$ の濃度を大きくするとEq. (6)の反応により、結果的に生成される O_2^- の量も増大するはずである。従って、Fig. 4の540nmにおいて観測された吸光度の増加が O_2^- とNBTとの反応であるならば、ギ酸ナトリウム濃度の増大にともない吸光度の増大が観測されるであろう。ギ酸ナトリウムの濃度を変えた実験結果をFig. 5に示した。図に示した吸光度はパルス照射後50 μs 及び500 μs における値である。捕捉剤濃度 [Scavenger] と生成物 [M] との間には次のような1/3乗の関係が成立することがSworski⁷⁾により示されている。

$$[M] \propto [Scavenger]^{1/3} \quad (11)$$

Fig. 5の結果では、ギ酸ナトリウムが0.1M以下の濃度では上記関係が間接的に成立している。従って、540nmにおいて観測された吸光度の増大は O_2^- とNBTとの反応に対応する可能性が高い。また、捕捉効果としてFig. 5の結果をみた場合、 $HCOO^-$ の捕捉効果が有効に作用する濃度の上限値は0.1M程度であり、それ以上濃度を大きくしても効果はないといえる。

照射生成物の吸収スペクトルと市販されているブルーホルマザンの吸収スペクトルを比較したところ、両者のスペクトルは400–600nmの範囲でほとんど同じであり、本反応系において目的とする O_2^- とNBTとの反応が生じていることは確かと判断した。 O_2^- の250nmにおける減少速度とブルーホルマザンの生成速度を比較することができれば、より定量的な議論が可能であるが、NBT自身の吸光度が250nmにおいて非常に大きいため、今回の実験では両者の比較はできなかった。

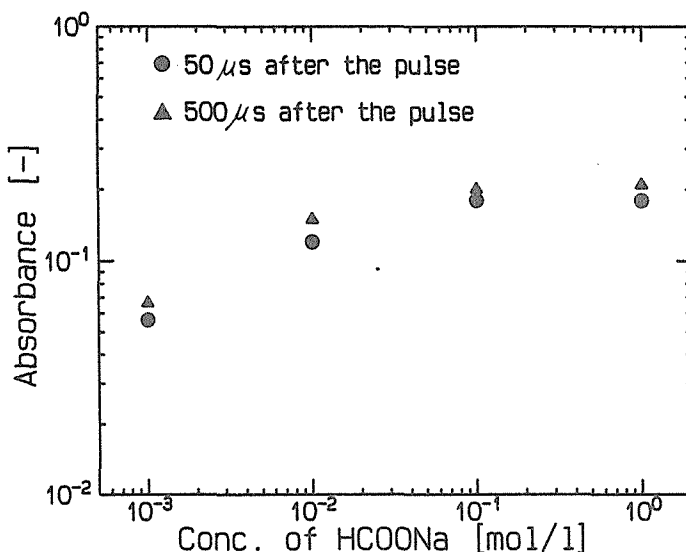


Fig. 5 Effects of concentration of HCOONa, which acts as a scavenger of $\cdot OH$, on productivity of O_2^-

マイクロ秒領域のパルスラジオリシスにより得られた吸収スペクトルの変化をFig. 6 に、ナノ秒領域のパルスラジオリシス法によって得られた吸収スペクトルの時間変化をFig. 7 に示した。図中の実線はガウス分布を仮定して実測値を結んだものである。Fig. 6 から分かるように、電子線パルス照射後、早い時間域では420nmに吸収があるが、時間経過と共にその吸収は減少し、逆に540nm付近の吸光度が時間経過と共に増大する。420nmにおける吸光度の減少速度と540nmにおける増加速度は対応しており、本反応系では420nmに吸収をもつ中間体を経て530nmに吸収をもつ生成物へと変化していると予想される。一方、より早い時間領域で得られたスペクトル (Fig. 7) では、420nmの吸光度は変化しないが、460nm以降の吸光度の増大が観測されている。

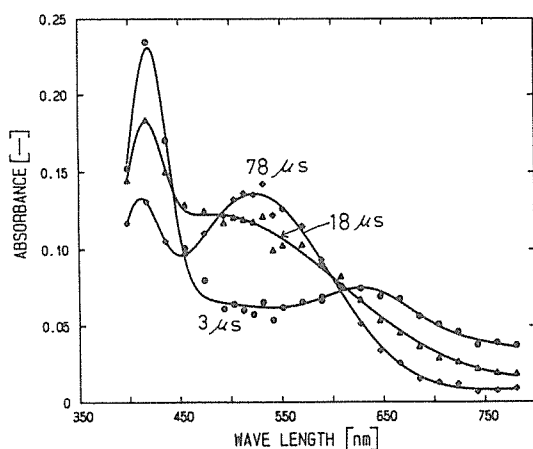


Fig. 6 Absorption spectra obtained by microsecond pulse radiolysis

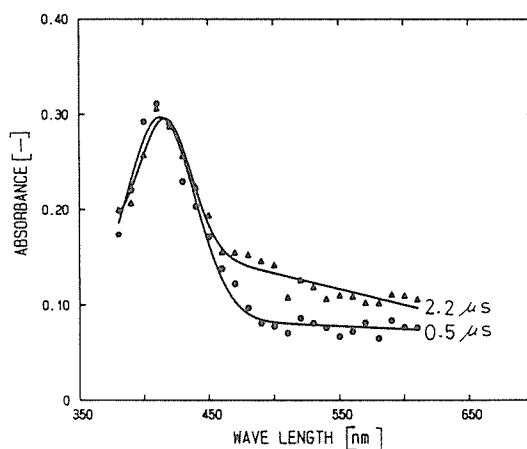
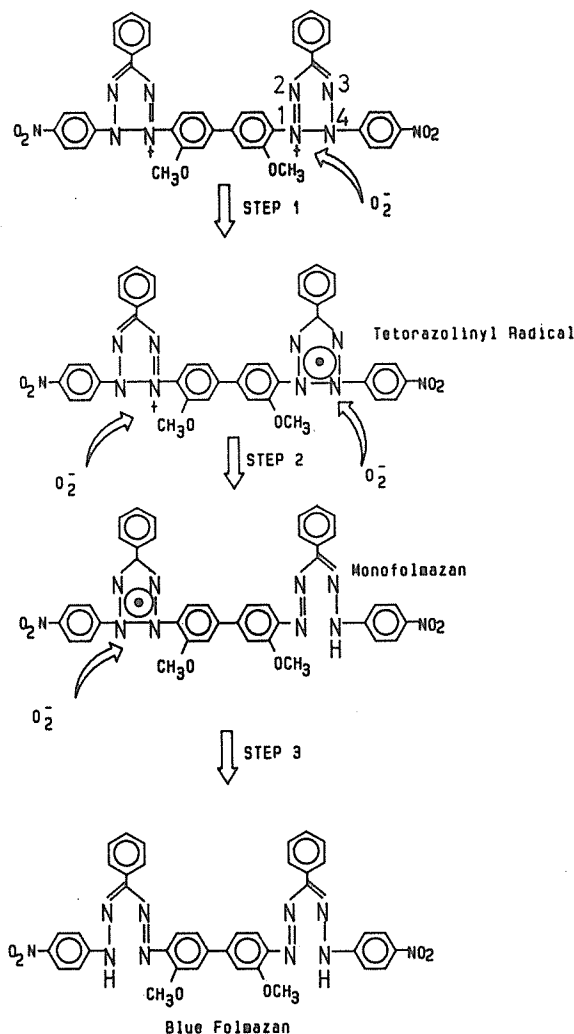


Fig. 7 Absorption spectra obtained by nanosecond pulse radiolysis

以上の結果をもとに、本反応系における反応機構を考え、Fig. 8 に示した。No. 1 の窒素は sp^2 混成軌道をとっているが電子が欠乏しており、 O_2 は初めにこの窒素に電子を与え1電子還元を行う。この反応は、両者の電荷を考慮すると極めて速く進行すると考えられ、Fig. 7 にみられる電子線パルス照射直後においてすでに観測される420nmの吸収に対応している。このテトラゾールリングへの1電子還元によりテトラゾリニルラジカル (Tetrazolynyl Radicals) が生成される (step 1)。このテトラゾリニルラジカルは、Fig. 9 に示すようにいくつかの共鳴構造が考えられ、電子はテトラゾールリングの分子軌道上に非局在化して存在する。また、共鳴エネルギーにより安定化されやすいためテトラゾリニルラジカルは極めて生成されやすい。さらに、テトラゾリニルラジカルのリング上に非局在化した電子は、ベンゼンの π 軌道とも相互作用する結果、 π 軌道を経由して分子内電子移動し、芳香核にも非局在化することが考えられる。次のステップでは、 O_2 がテトラゾリニルラジカルに1電子を与えてモノホルマザンを生成し、この反応が500nm近傍における吸光度の増加に対応していると考えられる。一方、Fig. 7 にみられるように、420nmにおける吸光度は、500nm近傍の吸光度が2.2 μ s後に増大しても減少していないが、これはNBTがもう一つテトラゾールリングをもつため、そのリングが O_2 により1電子還元を受けテトラゾリニルラジカルを生成することに対応する。次のStep 3 で最終生成物であるブルーホルマザンが生成される。

Fig. 8 Reaction scheme between O_2^- and NBT

NBT自身の吸収スペクトルは短波長領域(220, 260nm)にのみ吸収を示すが、テトラゾールリングのN-N結合が切れることにより吸収スペクトルは長波長側へシフトする。この点は色素分子における分子内電荷移動を考える上で興味深い。つまり、N-N結合が切れることにより吸収スペクトルが長波長側へ移動したことはHOMO (highest occupied molecular orbital) とLUMO (lowest unoccupied molecular orbital) 間のエネルギー差が減少したことを意味する。このエネルギー差には電子供与性基と電子求引性基の効果が大きく影響している。このような点を検討するには、 π 電子系の励起エネルギーを計算できるPariser-Parr-Pople分子軌道法による計算が有効であり、今後検討を行っていきたいと考えている。

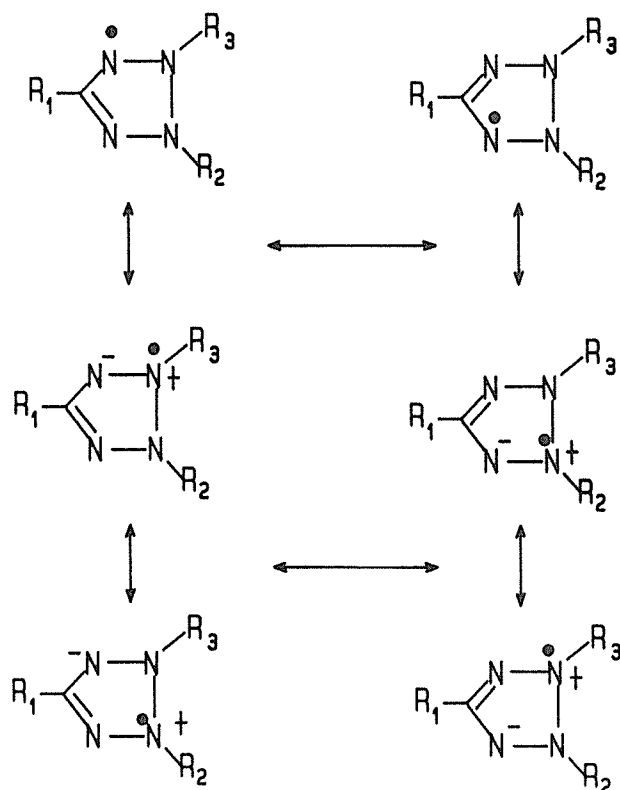


Fig. 9 Resonance hybrid of Tetrazoliny radicals

4. 結 言

パルスラジオリシス法によりスーパーオキシドアニオンラジカル $\text{O}_2^{\cdot -}$ の生成とニトロブルーテトラゾリウムとの反応を検討した。 NBT を含む酸素飽和した 0.2M ギ酸ナトリウム水溶液を用いて得られた吸収スペクトルの時間変化より、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ と NBT との反応機構について検討した。 $\text{O}_2^{\cdot -}$ からの1電子移動により中間体としてテトラゾリニルラジカルが生成され、その後さらに1電子還元されてモノホルマザンとなり、最終的に4電子還元されブルーホルマザンになると解釈すると、実験結果をよく説明できることを示した。

謝 辞

本研究で用いたパルスラジオリシス体系の改良及び 45MeV LINACの調整にあたっては、瞬間強力パルス状放射線発生装置研究室の谷田弘明氏、佐藤孝一氏の多大なるご協力を頂きました。また、短波長領域における $\text{O}_2^{\cdot -}$ の観測にあたっては、上記研究室の太田信之君、秋山 良君、藤原朋春君、三宅俊介君のご協力を頂きました。ここに深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 仁木鋭雄, 島崎弘幸 編: 活性酸素, (1987), 医歯薬出版
- 2) 日本化学会 編: 季刊化学総説, 有機電子移動プロセス, (1988), 学会出版センター
- 3) Bielski, B.H.: Photochem. Photobiol., 28, (1978), p645
- 4) 秋山 良 他: 日本原子力学会北海道支部第9回研究発表会講演要旨集, p20 (1991)
- 5) 近藤正春, 篠崎善治: 放射線化学, (1980), コロナ社
- 6) Hengelein, A., W. Schnabel and J. Wendenburg 著, 相馬 他訳: 基礎放射線化学, (1972), 化学同人
- 7) H.A. Mahlman and T.J. Sworski, The Chemistry of Ionization and Excitation, p. 259, Taylor & Francis Ltd., London (1967)