

## メタンスルフィン酸の生成に基づくヒドロキシルラジカル的高速液体クロマトグラフ間接定量

蒲生 啓司<sup>®</sup>, 坂本 真紀<sup>\*</sup>

(1994 年 4 月 1 日受理)

ヒドロキシルラジカルがジメチルスルホキシドとの反応によって生成するメタンスルフィン酸に着目し、これとジアゾニウム塩のカップリング反応により生成するジアゾスルホンを溶媒抽出後、逆相分配 HPLC により分離・検出するヒドロキシルラジカル間接定量法を検討した。メタンスルフィン酸ナトリウムを標準試料として、ジアゾスルホン検出のための最適条件を検討した結果、 $0.5 \sim 10 \times 10^{-3} \text{ mM}$  の濃度範囲でジアゾスルホンのピーク面積値との間に直線関係が得られ、検出下限は  $0.25 \times 10^{-3} \text{ mM}$  であった。本法を、Fenton 反応によるヒドロキシルラジカルの発生系に応用した結果、過酸化水素濃度  $10 \sim 200 \times 10^{-3} \text{ mM}$  の範囲において、メタンスルフィン酸由来のジアゾスルホンのピーク面積値との間に良好な直線関係が認められ、これにより、 $80 \times 10^{-3} \text{ mM}$  の過酸化水素から  $8.8 \times 10^{-3} \text{ mM}$  のヒドロキシルラジカルの発生が確認された。

### 1 緒 言

ヒドロキシルラジカル (OH ラジカル) は、スーパーオキシド陰イオン、過酸化水素、及び一重項酸素と共に活性酸素種として知られ、生体内における代謝、殺菌、生理活性物質の産生に関与する一方で、DNA 損傷や発がん性物質の水酸化による発がん、あるいは各種炎症の発現に大きくかかわる化学種として注目されてきた<sup>1)2)</sup>。OH ラジカルは、過酸化水素やスーパーオキシド陰イオンから生ずる最終の活性型酸素であると言われ、生体内成分に対する反応性も高く、短寿命であり、定量性はもちろん、特異性や感度的に優れる測定法はいまだ確立されていない。

すなわち、吸光光度法や HPLC によるものには、フェノール類の水酸化反応に基づき、生成するカテコール<sup>3)</sup>やヒドロキノン<sup>4)</sup>を検出する方法を始めとして、数多くの測定法が知られているが、いずれも一長一短がある。一方、ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いる OH ラジカルの測定法として、Russel 反応により生成するホルムアルデヒドの検出方法が報告されているが<sup>5)</sup>、ホルムアルデヒドがメチルラジカルに由来するため、その生成量が不正確であるうえ、検出感度が低いなどの問題が残されている。

最近 Steiner らは、同じ Russel 反応において生成するメタンスルフィン酸に着目し、これとジアゾニウム塩とのカップリング反応により生成するジアゾスルホンを溶媒抽出後、比色定量する方法を報告している<sup>6)</sup>。この方法は反応の選択性に優れ、高感度検出も期待できるが、吸光光度法では反応による副生成物や系内のきょう雑物との分離がなされないため、定量性には疑問が残されている。そこで著者らは、ジアゾスルホンの検出に逆相系 HPLC を用いる、OH ラジカルの間接定量法の確立を図った。

ところで、標品としての OH ラジカルが存在しない限り、OH ラジカル発生のモデル系とその発生量については常に問題となる点であるが、少なくともスピントラップ法による ESR スペクトル上、OH ラジカルの発生が確認されている反応系をモデル系として用いることは妥当である。従って本研究においても、その確認を行った Fenton 反応及び過酸化水素の UV 照射を OH ラジカル生成のモデル系として選んだ。次いで、これらの DMSO 共存下での反応を検討し、生成するメタンスルフィン酸をジアゾスルホンとして HPLC 検出し、その定量値より OH ラジカルの存在量を推定することとした。

なお、反応には Babbs らの方法<sup>7)</sup>に準じて、最もモル吸光係数の高いジアゾスルホンが得られるファストブルー BB 塩をジアゾニウム塩として用いることとした。

\* 高知大学教育学部: 780 高知県高知市曙町 2-5-1

## 2 実 験

## 2.1 試 薬

メタンスルフィン酸ナトリウムは Fairfield Chemical 製, ファストブルー BB 塩 (4-ベンゾイルアミノ-2,5-ジエトキシベンゼンジアゾニウムクロリド) は Sigma 製, DMSO 及び硫酸鉄(II) は和光純薬製を用いた. 過酸化水素は三菱瓦斯化学製を過マンガン酸カリウムで滴定後標定して用いた. その他の溶媒及び試薬は市販特級品を用いた.

## 2.2 装置及び HPLC 条件

HPLC 装置として, 送液ポンプ LC-10AD 型, 紫外可視吸光光度検出器 SPD-10AV 型, カラム恒温槽 CTO-6A 型, 記録計 C-R4A 型 (いずれも島津製作所製), 及び Rheodyne 製サンプルインジェクター 7125 型を用いた. 光反応装置として低圧水銀ランプ (アリオン製) を設置した内部照射型反応装置 (シゲミスタンダード商事製) を用いた.

ジアゾスルホンの分離・検出については, 逆相分配モード用の ODS カラム (島津テクノリサーチ製 STR-ODSII 5  $\mu$ m, 内径 4.6 mm, 長さ 250 mm) を, カラム温度 40°C で用いた. 移動相としてアセトニトリルと水との混合液 (8:2, v/v) を, 流量 0.7 ml/min で用いた. 検出波長は 420 nm とし, 反応溶液の 5  $\mu$ l をカラムに注入した.

## 2.3 ジアゾスルホンの調製

標品としてのジアゾスルホンは, 50 mM メタンスルフィン酸ナトリウム 5 ml に, 50 mM ファストブルー BB 塩水溶液 5 ml を加え, 暗所室温において 10 分間反応させ, 生成したジアゾスルホンを水で洗浄しながら吸引濾過し, 窒素気流下で乾燥したものを標品として用いた.

## 2.4 定量操作

標品としてのメタンスルフィン酸ナトリウム水溶液, 又はメタンスルフィン酸を含む試料 0.5 ml に, 2 M 硫酸を 0.1 ml 加えて硫酸酸性として, 更にブタノール 1.0 ml を加えて十分に振り混ぜ, ブタノール相 0.4 ml を分取した. ここに 500 mM 酢酸ナトリウム水溶液 0.5 ml を加えてメタンスルフィン酸をナトリウム塩として転溶させ, その水相 0.4 ml を分取し, 10 mM ファストブルー BB 塩 0.5 ml を加えてジアゾスルホンを生成させ, 最後にクロロホルム 0.5 ml を加えてジアゾスルホ

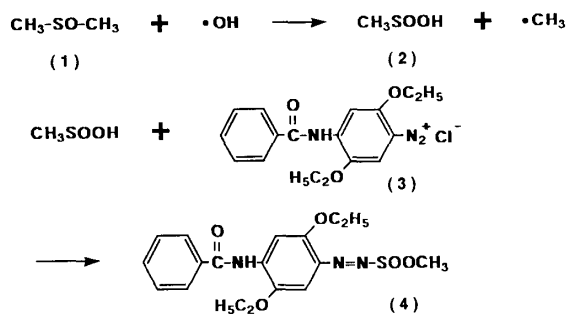


Fig. 1 General scheme for the formation of methanesulfinic acid and diazosulfone.

(1) DMSO (dimethyl sulfoxide); (2) methanesulfinic acid; (3) diazonium salt; (4) diazosulfone.

ンを抽出し, HPLC 用の試料とした.

## 2.5 OH ラジカルの発生系及びメタンスルフィン酸の生成

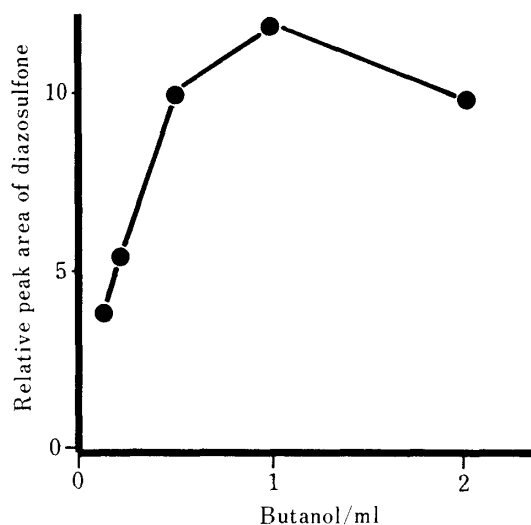
Fenton 反応における OH ラジカルの発生とメタンスルフィン酸の生成: 一定濃度に調製した過酸化水素を含む 100 mM の DMSO 水溶液 1 ml を, 硫酸鉄を含む 100 mM の DMSO 水溶液 1 ml 中に添加し, 生成したメタンスルフィン酸を定量した.

過酸化水素の UV 照射における OH ラジカルの発生とメタンスルフィン酸の生成: 過酸化水素を含む 100 mM の DMSO 水溶液に, 低圧水銀灯を用いて一定時間光照射し, 生成したメタンスルフィン酸を定量した.

## 3 結果及び考察

本研究における OH ラジカルによるメタンスルフィン酸の生成, それに続くジアゾニウム塩とのジアゾスルホンの生成反応を Fig. 1 に要約した. すなわち, 既知濃度のメタンスルフィン酸 (ナトリウム塩) 標品を用い, それから得られるジアゾスルホンを HPLC 上の基準クロマトグラムとした. 一方, DMSO から OH ラジカルによって生成するメタンスルフィン酸を測定することによって, 系内に発生した OH ラジカルの濃度を間接的に定量することができると考え, 初めにジアゾスルホンの吸光光度検出による逆相系 HPLC と, 検出下限について検討した.

メタンスルフィン酸は, それ自身ではジアゾニウム塩との反応収率が低いため, 一度ナトリウム塩等に通じる必要がある. 従って, 既知濃度のメタンスルフィン酸ナトリウムから得られるジアゾスルホンを基準クロマトグラムとして, 以下 OH ラジカル定量のための最適条件を



**Fig. 2** Effect of the extraction volume of butanol on the formation of methanesulfinic acid.

Reaction conditions: 1 mM sodium methanesulfinate (0.5 ml), 10 mM fast blue BB salt (0.5 ml), chloroform (0.5 ml). HPLC conditions: column, STR-ODS II (4.6 mm i.d. × 250 mm); mobile phase, acetonitrile/water (8 : 2); flow rate, 0.7 ml/min; column temperature, 40°C; detection, 420 nm

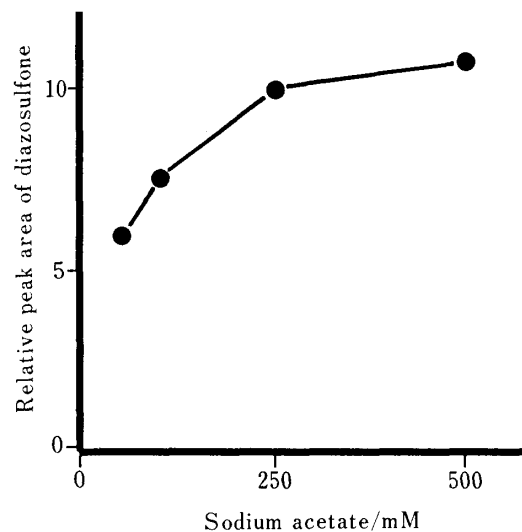
検討した。

なお, Babbs らの報告<sup>7)</sup>では, ジアゾスルホンの吸光度定量法の際, 抽出に用いる有機溶媒としてトルエン-ブタノール混合液を用いているが, 抽出効率とクロマトグラム上のきょう雑成分を比較した結果からは, クロロホルムが最も高い抽出効率を示し, きょう雑成分も少なかったため, 本実験ではクロロホルムを抽出溶媒として用いた。

実試料に則した前処理法を考慮すると, 系内に生成したメタンスルフィン酸の検出のためには, 定量操作で述べた多段階操作が必要である。比色定量法と同様に, ジアゾスルホンの溶解性から考えて, HPLC においても溶媒抽出操作を省くことはできなかった。従って, ここではメタンスルフィン酸抽出時のブタノール量, メタンスルフィン酸転溶時の酢酸ナトリウム濃度及びジアゾスルホン抽出時のクロロホルム量の最適条件を求めた。

### 3・1 ジアゾスルホン標品とクロマトグラム

合成したジアゾスルホンは, <sup>1</sup>H-NMR スペクトルにより 95% 以上の純度を有することを確認した。又, 本化合物は, 上記逆相系 HPLC で保持時間 8.1 分に単一のピークを与えた。



**Fig. 3** Effect of the concentration of sodium acetate on the back extraction of the methanesulfinic acid in butanol.

Reaction conditions and HPLC conditions are the same as in Fig. 2.

### 3・2 メタンスルフィン酸抽出時のブタノール量

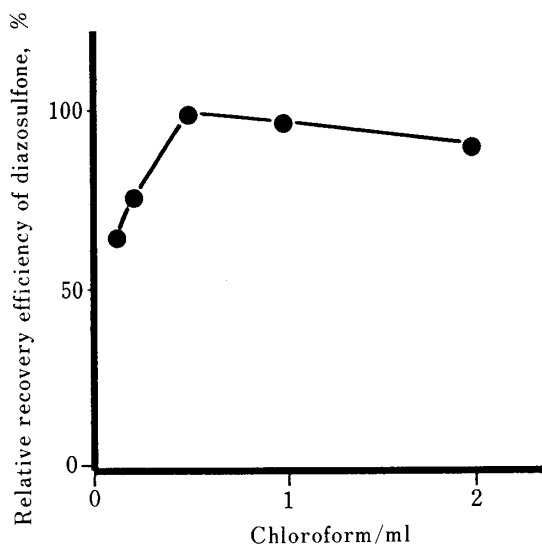
1 mM のメタンスルフィン酸ナトリウム水溶液 0.5 ml を用いて, 抽出に用いる至適ブタノール量を 0.1~2 ml の容量範囲で検討した (Fig. 2)。その結果, ジアゾスルホンの最大ピーク面積値を示した, 1 ml を用いることとした。

### 3・3 メタンスルフィン酸転溶時の酢酸ナトリウム濃度

1 mM のメタンスルフィン酸ナトリウム水溶液 0.5 ml を用いて, ブタノール抽出後のメタンスルフィン酸転溶に用いる至適酢酸ナトリウム濃度を 50~500 mM の範囲で検討した (Fig. 3)。その結果, 250 mM を超えたところでジアゾスルホンのピーク面積値はほぼ一定に達したが, 最大値を示した 500 mM を用いることとした。

### 3・4 ジアゾスルホン抽出時のクロロホルム量

1 mM のメタンスルフィン酸ナトリウム水溶液 0.5 ml を用いて, ジアゾスルホン抽出に用いる至適クロロホルム量を検討した。Fig. 4 には, クロロホルム 50 µl~2 ml の容量範囲で検討した際のジアゾスルホンの相対回収率を示した。ここでの結果は, 溶媒量を少なくすることでジアゾスルホンの濃縮抽出が可能であることを示しているが, クロロホルム量が 0.1 ml 以下になると回収



**Fig. 4** Effect of the volume of chloroform on the extraction of diazosulfone.

Reaction conditions (except for volume of chloroform) and HPLC conditions are the same as in Fig. 2.

率が約 65% まで減少するため、0.5 ml をクロロホルムの至適容量とした。

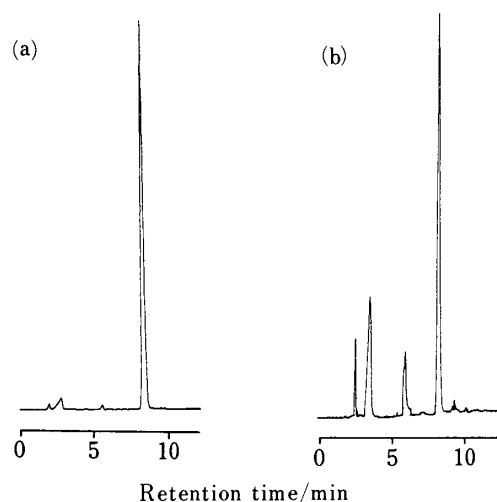
### 3・5 メタンスルフィン酸の検出下限

以上の検討結果に基づいて、1 mM のメタンスルフィン酸ナトリウム水溶液 0.5 ml より生成したジアゾスルホンのクロロホルム溶液 (5  $\mu$ l) のクロマトグラムを Fig. 5(b) に示した。ジアゾスルホン標品のクロマトグラムからは見られない反応副生物と思われるピークが現れているが、定量には影響を与えない。このピーク面積値と、1 mM のジアゾスルホン標品から得られるピーク面積値との比較によって、一連の前処理を含めたメタンスルフィン酸からジアゾスルホンの生成収率が約 92% であると算出された。

更に、メタンスルフィン酸ナトリウムの低濃度域における直線性を検討した結果、 $0.5 \sim 10 \times 10^{-3}$  mM の濃度範囲でピーク面積値との間に直線関係が認められ、検出下限濃度は  $0.25 \times 10^{-3}$  mM ( $S/N=3$ ) であった。

### 3・6 Fenton 反応における OH ラジカルの検出

従来から知られてきた次の二つの OH ラジカル発生系に適用し、発生するラジカルの定量を試みた。過酸化水素を発生源とする Haber-Weiss 反応に基づく OH ラジカルの発生系については、既に多くの報告例があるので、それに従って OH ラジカルを発生させ、メタンス



**Fig. 5** Chromatograms of the diazosulfone derived from sodium methanesulfinate

(a) diazosulfone synthesized, (b) reaction mixture. HPLC conditions are the same as in Fig. 2.

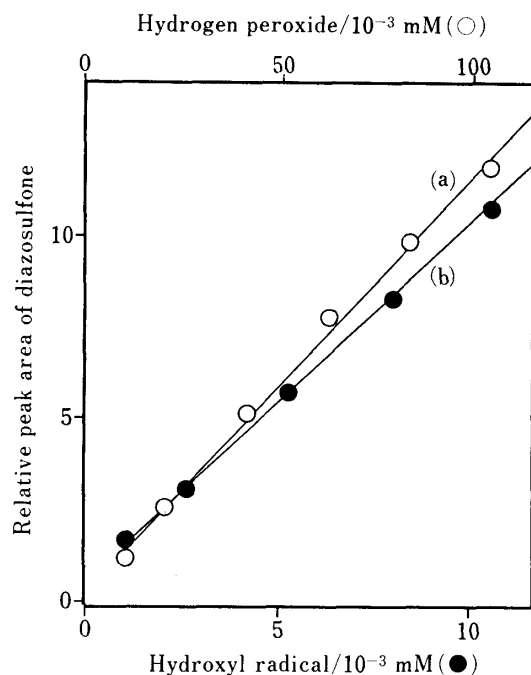
ルフィン酸の生成に基づくジアゾスルホンの検出を試みた。すなわち、過酸化水素濃度を 1 mM に固定して、反応に用いる硫酸鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) の至適濃度を求めたところ、4 mM でジアゾスルホンの最大ピーク面積値を示したので、以下この濃度比に基づいて検討した。

同様の操作により、過酸化水素の低濃度域における直線性を検討した結果、 $10 \sim 200 \times 10^{-3}$  mM の濃度範囲において、OH ラジカルの発生により生成したと考えられるメタンスルフィン酸由来のジアゾスルホンのピーク面積値との間に良好な直線関係が認められた。

この結果を、先の 3・5 で得られた結果と共に検量線として Fig. 6 に示した。この検量線によれば、 $80 \times 10^{-3}$  mM の過酸化水素から  $8.8 \times 10^{-3}$  mM の OH ラジカルが発生することになるので、Fenton 反応における OH ラジカル発生率は約 11% と算出された。この値は、先のチオバルビツール酸法の改良法<sup>8)</sup>から得られた値よりも若干低値ではあるが、その理由については、それが吸光光度法であるということや、反応に用いる金属種の違い等が考えられる。この点については、測定方法の違いによる直接比較等、今後更に検討を加えていかなければならない。

### 3・7 過酸化水素の UV 照射における OH ラジカルの検出

過酸化水素の DMSO 水溶液を用いて、低濃度域における直線性を検討した結果、 $10 \sim 200 \times 10^{-3}$  mM の濃



**Fig. 6** Calibration curves of hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

(a) relationship between  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration and diazosulfone derived from the reaction of DMSO and  $\cdot\text{OH}$ , (b) relationship between  $\cdot\text{OH}$  concentration and diazosulfone derived from sodium methanesulfinate

度範囲において,  $\text{OH}$  ラジカルの発生により生成したと考えられるメタンスルフィン酸由来のジアゾスルホンのピーク面積値との間に良好な直線関係が認められた。

この結果を, 先の 3・5 で得られた結果と共に検量線として示した。この検量線によれば,  $80 \times 10^{-3} \text{ mM}$  の過酸化水素から  $7.4 \times 10^{-3} \text{ mM}$  の  $\text{OH}$  ラジカルが発生することになるので, 過酸化水素-DMSO 水溶液の UV 照射実験における  $\text{OH}$  ラジカル発生率は, 約 9.2% と

見積もることができる。

なお,  $\text{OH}$  ラジカルスキャベンジャーとしてよく使われているチオ尿素を, 反応系に濃度  $0.5 \sim 5 \text{ mM}$  の範囲で添加した実験では, いずれの系においてもジアゾスルホンのクロマトグラム上のピークは観察されず,  $\text{OH}$  ラジカルと DMSO との反応が抑制されることが観察された。

本法は, 操作手順等で比色定量法より優れるものではないが, 被測定試料が比色定量法に比べて少量ですむばかりではなく, きょう雑成分との分離機能が備わっている点で優れていると言える。更に, 感度的には比色定量法と比べて約 10 倍程度が高いことが分かった。

以上, 本研究は多段階に及ぶ前処理を含むため, 操作が煩雑になるが, ジアゾスルホンの HPLC 検出を  $\text{OH}$  ラジカルの定量に応用した例としては初めての方法であり, 検出の選択性及び感度が高いことから, 生体試料等への応用が期待される。

## 文 献

- 1) 八木國夫, 中野 稔監修: “活性酸素”, (1987), (医歯薬出版)。
- 2) 中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦編: “活性酸素”, (1988), (共立出版)。
- 3) Y. Yoshimura, K. Otsuka, K. Uchiyama, H. Tanaka, K. Tamura, K. Ohsawa, K. Imaeda: *Anal. Sci.*, **5**, 161 (1989)。
- 4) 能田 均, 李 明求, 渡邊知仁, 長岡寛明, 大倉洋甫: *分析化学*, **38**, 562 (1989)。
- 5) S. M. Klein, G. Cohen, A. I. Cederbaum: *Biochemistry*, **20**, 6006 (1981)。
- 6) M. G. Steiner, C. F. Babbs: *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 478 (1990)。
- 7) C. F. Babbs, M. J. Gale: *Anal. Biochem.*, **163**, 67 (1987)。
- 8) 今井 弘, 荒井善一, 中井安雄: *日化*, **1993**, 1047。



**Indirect liquid chromatographic determination of hydroxyl radical based on the production of methanesulfinic acid.** Keiji GAMOH and Maki SAKAMOTO (Faculty of Education, Kochi University, 2-5-1, Akebono-cho, Kochi-shi, Kochi 780)

An indirect liquid chromatographic determination method for the hydroxyl radical in an aqueous system was described. The method is based on the production of methanesulfinic acid as the primary product by the reaction of hydroxyl radical with dimethyl sulfoxide. The methanesulfinic acid formed was coupled with diazonium salt to afford the diazosulfone derivative, which was detected and equantified by reversed-phase liquid chromatography at 420 nm. The practical conditions for the methanesulfinic acid detection were optimized. Linearity of the methanesulfinic acid formation was observed in the range from  $0.5 \times 10^{-3} \text{ mM}$  to  $10 \times 10^{-3} \text{ mM}$ . To evaluate this method for estimat-

ing hydroxyl radical production, two model systems, including the Fenton reaction and ultraviolet photolysis of hydrogen peroxide were studied. The theoretical maximum yield of hydroxyl radical in the systems could be calculated and compared to the measured dimethyl sulfoxide oxidation. The estimated concentration of hydroxyl radical from  $80 \times 10^{-3}$  mM of hydrogen peroxide in the Fenton reaction was  $7.4 \times 10^{-3}$  mM. The present method may prove useful for detecting hydroxyl radical involvement in biological samples.

(Received April 1, 1994)

***Keyword phrases***

hydroxyl radical; conversion of dimethyl sulfoxide into methanesulfinic acid; diazosulfone formation; reversed-phase HPLC.

---