

HPLC-ESR スペクトロメトリー

岩橋 秀夫*

はじめに

フリーラジカルは生命化学の領域において（特に医学の領域にいて）最近注目されるようになった。生化学における酵素反応機構の研究等の限られた分野だけでなく、炎症、癌、老化など医学の広い範囲においてフリーラジカルが関与することが知られるようになった。ここで紹介する装置は電子スピン共鳴 (ESR) 装置と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を接続し、フリーラジカルの分離分析を行うものである (図1)¹⁾。

構成および構造

私共が用いているシステムについて述べる²⁾。通常の HPLC システム (日本分光 Trirotar IV) に逆相カラム C₁₈ を接続した。逆相カラムには東洋ソーダ, TSK-C₁₈ (5 μm) を充填したものをを用いた。カラム温度調節のためカラムは循環式恒温相にしたし、カラム温度を制御した。HPLC のインジェクター部分は大量のサンプルの注入を可能にするためにステンレスチューブをコイル状に巻き 3 cc までのサンプルの注入を可能にした。

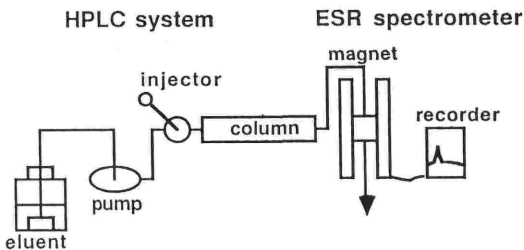


図1

HPLC より溶出した移動相は直接 ESR (日本電子 FX2XG スペクトロメーター) の検出部分に導入した。検出部分への移動相の導入には直径 0.5 mm 程度のテフロンチューブを用いた。検出部分でのテフロンチューブの固定は有機溶媒用の ESR 試料管を用いた。底部を切断した有機溶媒用試料管を ESR 検出部分に固定し、試料管上部よりテフロンチューブを挿入し試料管下部を貫通さす。試料管の上端部分と下端部分でテフロンチューブを試料管に固定した。ESR 測定磁場は予想されるラジカル種の共鳴位置に固定し、HPLC によりラジカル種を分離している間 ESR のレコーダーのチャート用紙を一定のスピードで送った。

測定例

実際の測定例を示す³⁾。大豆リポキシゲナーゼはリノール酸、リノレイン酸、アラキドン酸など不飽和脂肪酸の脂質過酸化反応を触媒する。この反応はラジカル中間体を經由して進行すると考えられている。それぞれの反応液中に生成するラジカル種をニトロソベンゼンをスピントラップ剤として検出した。図2 (左) に示されているような ESR スペクトルがそれぞれ得られた (a: linoleic acid, b: linolenic acid, c: arachidonic acid)。3種のスペクトルは互いにほとんど区別することができず、同一のラジカルが生成しているかのように思われた。しかし、図2 (左) の矢印の位置に磁場を固定し HPLC-ESR 分析を行うと、図2 (右) の様な溶出パターンが得られ、明らかに3種の異なるラジカル種が存在することがわかった。このように HPLC-ESR 分析は ESR スペクトルの超微細構造 (hyperfine structure) のみでは区別でき

*和歌山県立医科大学化学

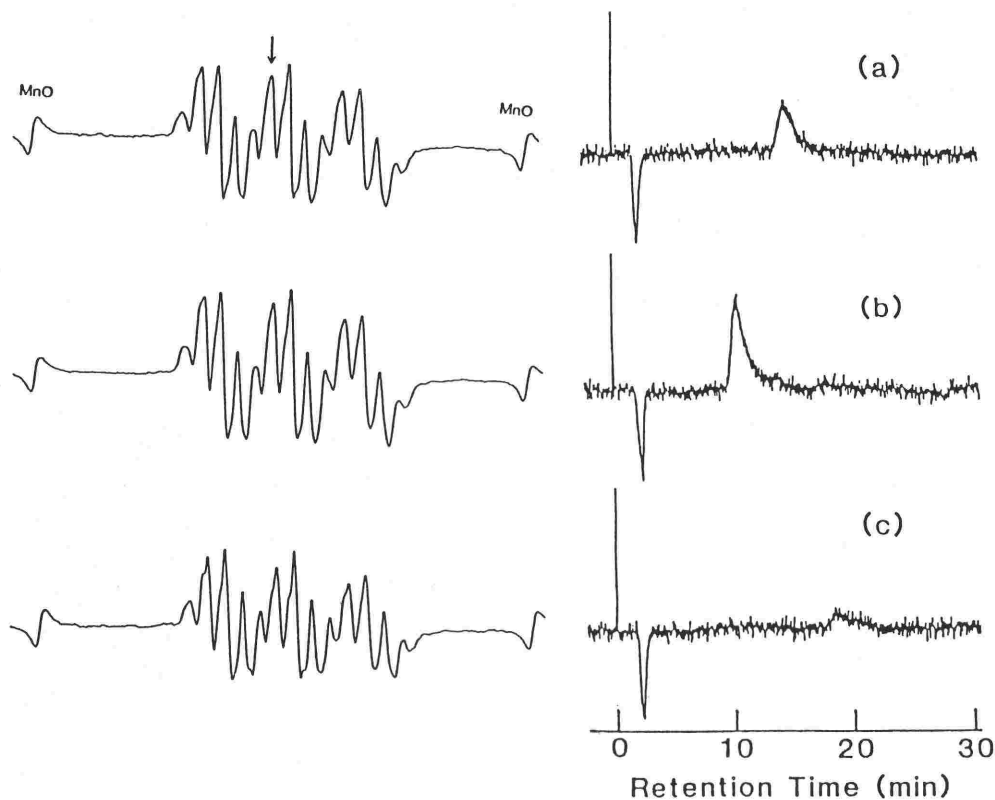


図2

ないラジカル種を分離することが可能である。

使用上の問題点および今後の展望

図2で得られた HPLC-ESR 分析には 0.5 ml の反応溶液を注入する必要があるが、通常の HPLC 分析に比べ大容量であった。このように HPLC-ESR 分析は感度の点で劣る。感度の改善は ESR と共に UV や ECD (electrochemical detector) を検出器として用いることにより改善されるであろう⁴⁾。HPLC-ESR 分析では通常30分程度の分析時間が必要であり、不安定なラジカルの場合には検出が困難となる可能性がある。事実、図2で示した HPLC-ESR 分析もカラム温度を25

度から40度に上げ、分析を行った場合、全くピークが認められなかった。移動相の pH もラジカル種の寿命に影響すると思われ、移動相の選択についても検討する必要がある。

文 献

- 1) Makino, K., and Hatano, H. *Chem. Lett.* (1979). 119.
- 2) Iwahashi, H., Ikeda, A., Negoro, Y., and Kido, R. *Biochem. J.* 236 (1986) 509.
- 3) Sugata, R., Iwahashi, H., Ishii, T., and Kido, R. *J. Chromatogr. in press.*
- 4) Iwahashi, H., Negoro, Y., Ikeda, A., and Kido, R. *J. Chromatogr.* 391 (1987) 199.