

# 光励起リボフラビンによるアスコルビン酸からの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成機構

著者名(日)	金松 澄雄, 玉元 奈律美, 白江 好友
雑誌名	共立女子短期大学生活科学科紀要
巻	61
ページ	15-24
発行年	2018-02
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1087/00003185/">http://id.nii.ac.jp/1087/00003185/</a>

# 光励起リボフラビンによるアスコルビン酸からの $H_2O_2$ の生成機構

金松澄雄, 玉元奈律美\*, 白江好友\*

## An $H_2O_2$ Generation Pathway for Riboflavin-sensitized Oxidation of Ascorbic Acid

*Sumio KANEMATSU, Natsumi TAMAMOTO\* and Yoshinori SHIRAE\**

An  $H_2O_2$  generation pathway for ascorbic acid (Asc) oxidation in the presence of sensitized riboflavin (Rib) was investigated by analyzing the stoichiometric relation between  $H_2O_2$ , Asc and  $O_2$ . When 1.25 or 12.5  $\mu M$  Rib was present, the  $O_2$  uptake rate of Asc photooxidation increased linearly with increasing light intensity. The molar ratio of the amount of  $O_2$  uptake to the amount of  $H_2O_2$  produced increased with increasing light intensity, and then became a constant value of approx. 0.5. With 0.125  $\mu M$  rose bengal (RB) instead of Rib, the ratio of  $H_2O_2/O_2$  did not depend on light intensity, and was about 0.5. When 1.25  $\mu M$  RB was used, the ratio showed similar patterns to those of Rib, and a constant value of approx. 0.6 was obtained.

To determine the contribution of Type I and Type II reactions in Asc photooxidation, the effect of SOD and  $^1O_2$  quencher on the  $O_2$  uptake rate was investigated. The results showed the occurrence of not only Type II but also Type I reactions. When Asc was oxidized completely in open air, the stoichiometry of Asc to  $H_2O_2$  was 1:2. Based on these results, we discussed a pathway of Asc photooxidation to accommodate the obtained values of  $H_2O_2/O_2$  and  $H_2O_2/Asc$ .

キーワード : photosensitizer 光増感剤, photooxidation 光酸化, ascorbic acid アスコルビン酸, riboflavin リボフラビン, hydrogen peroxide 過酸化水素

### 要 約

光励起リボフラビン (Rib) 存在下でのアスコルビン酸 (Asc) の光酸化における  $H_2O_2$  生成機構について, Asc,  $H_2O_2$ ,  $O_2$  間の化学量論関係をもちいて検討した。1.25  $\mu M$  または 12.5  $\mu M$  Rib の存在下, Asc の光酸化による  $O_2$  吸収速度は光強度に比例した。 $O_2$  吸収量に対する  $H_2O_2$  生成量のモル比は, 光強度の増大と

ともに増加し, 高光強度で約0.5の一定値になった。ローズベンガル (RB) を光増感剤とした場合は, 0.125  $\mu M$  Rb 存在下では,  $H_2O_2/O_2$  比は光強度に依存せず約0.5であった。1.25  $\mu M$  RB では, Rib の場合と同様の傾向を示し, 比は最終的に約0.6であった。Asc 光酸化における  $O_2^-$  が関与する Type I および  $^1O_2$  が関与する Type II 反応の寄与の割合を検討するために, SOD や  $^1O_2$  消光剤の影響を調べた結果, Type

\* 南九州大学健康栄養学部食品開発科学科

II反応と伴にType I反応も関与していることが示された。空気開放系でAscを完全に酸化させた場合、Ascと生じたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の化学量論関係は1:2であった。以上の結果から得られたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>比とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Asc比を満足させる反応機構を考察した。

## 結 言

近年の健康志向の高まりの中で、スポーツを積極的に生活に取り入れる人々が年々増加している<sup>1)</sup>。それに伴い、スポーツドリンク、ゼリー飲料、ドリンク栄養食品などスポーツ関連製品も大きな伸びを示しており<sup>2)</sup>、ドリンク等に対する人々の意識度が高いことが示されている。一方、インターネット上では自家製スポーツドリンクの作り方が数多く公開されているが、安易なドリンクの自作には危険を伴うこともあることはあまり認識されていない。リボフラビン(ビタミンB<sub>2</sub>, Rib)含有飲料とアスコルビン酸(ビタミンC, Asc)を含む他の飲料水や食品成分を混合した自作の健康・スポーツ飲料をジムや太陽光の下で飲用する際、身体に有害なH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が生成・蓄積する可能性があり、特に注意が必要である。

Ribは、主にFADやFNMの補酵素の成分としてフラボタンパク質に含まれ、生体内の酸化還元反応で重要な役割を演じている<sup>3)</sup>。Ribは熱に対しては比較的安定であるが、光には不安定である。Rib (<sup>1</sup>Rib)は基底状態が一重項状態であり、光照射によって励起されると励起一重項状態(<sup>1</sup>Rib\*)になり、直ちに系間交差(ISC)によって準安定な励起三重項状態(<sup>3</sup>Rib\*)に変換される。この<sup>3</sup>Rib\*は高い反応性を持ち、Type IおよびType IIの2つの異なる反応をおこなうことが知られている<sup>4, 5)</sup>。Type I反応では、<sup>3</sup>Rib\*が反応物との間で、水素原子または電子転移をおこなう。分子状酸素(三重項酸素, <sup>3</sup>O<sub>2</sub>)が存在する場合、<sup>3</sup>Rib\*からの1電子転移により、スーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)が生成される。その結果、O<sub>2</sub><sup>-</sup>の不均化反応により

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が蓄積する。一方、Type II反応では、<sup>3</sup>Rib\*から<sup>3</sup>O<sub>2</sub>へエネルギー転移が生じ、反応性の高い一重項酸素(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)が生じる。

アスコルビン酸は生体内では還元剤として種々の酸化還元反応に関与している<sup>6)</sup>。また、食品製造においては、抗酸化剤として広く用いられている。Ascは溶液状態では光に不安定である。Ribの光増感反応によるAscの光酸化については、これまでに多くの報告があるが、大部分は励起RibとAscの初期反応の速度論を扱ったものであり、Type IまたはType II反応によって生じるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成機構については副次的反応を含む可能性があることから、報告は少ない。その中でKramarenkoらはType II反応で生じる<sup>1</sup>O<sub>2</sub>がAscの光酸化を生じさせ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が生成することを報告している<sup>7)</sup>。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は、食品加工においては漂白剤、殺菌剤として用いられるが、釜揚げしらす、しらす干しを除き、分解または除去することによって最終食品には存在しないように定められている<sup>8)</sup>。これはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に発がん作用が疑われるからである<sup>9, 10)</sup>。自家製スポーツドリンクでRibとAscが混合された場合は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が生成される可能性があることから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成機構を明らかにすることは重要である。そこで、ここでは<sup>3</sup>Rib\*によるAscの光酸化におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成機構を検討した。その結果、Asc光酸化によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成反応にはType II反応によるAsc分子の多重酸化(合計4電子の酸化)が含まれることが示唆された。

## 材料と方法

### 試薬および材料

リボフラビン、ローズベンガル(RB)、テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)、アジ化ナトリウムはナカライテックより、アスコルビン酸は和光純薬工業より、1,4-ジアザビスクロ[2.2.2]オクタン(DABCO)は東京化成工業より購入した。超純水はミリポア製の超純水製造装置を用いて製造した。試薬類は全て超純水

で調整した。Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) はハウレンソウから精製したものをを用いた<sup>11)</sup>。ウシ肝臓カタラーゼはシグマアルドリッチより購入した。

### O<sub>2</sub>吸収速度と吸収量の測定

O<sub>2</sub>吸収の速度と量はクラークタイプの酸素電極 (ハンザ社) で測定した。20 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.8, 光増感剤 (Rib, RB) および反応物 (Asc, TEMED) より成る 1 ml の反応混液 (溶存 O<sub>2</sub>量は253 nmol) を用いた。光増感剤の励起はスライドプロジェクター (CABIN-III, キャビン工業製) からの白色光を、水の入った丸底フラスコで集光し、酸素電極の反応槽に照射した。光照射後、しばらく継続する O<sub>2</sub>吸収は、暗黒下で測定した。

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>量の測定

光照射で生じる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>量は、カタラーゼ (100 units) 添加で生じる O<sub>2</sub>量を 2 倍することにより算出した (図 1)。

## 結 果

### Rib 存在下での Asc の光酸化による光依存性および光非依存性 O<sub>2</sub>吸収

光増感剤 Rib 存在下, Asc の光酸化による O<sub>2</sub>吸収を O<sub>2</sub>電極を用いて測定した結果の 1 つを図 1 に示した。O<sub>2</sub>吸収は光照射開始後、直ちに始まり、一定速度で進行したが、照射を止めても O<sub>2</sub>吸収はしばらく続き、やがて停止した。そこで、光照射中の O<sub>2</sub>吸収を光依存性 O<sub>2</sub>吸収、光照射後の O<sub>2</sub>吸収を光非依存性 O<sub>2</sub>吸収として区別し、両者を合わせた量を全 O<sub>2</sub>吸収量とした。生成した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>量は、光照射を止めて O<sub>2</sub>吸収が停止した後、カタラーゼを添加して求めた。

### Asc 光酸化の光増感剤濃度依存性

12.5 μM までの種々の濃度の Rib 存在下, 15,000 lx の光照射で、0.5 mM Asc の光依存性 O<sub>2</sub>吸収の速度を調べた。その結果、O<sub>2</sub>吸収速

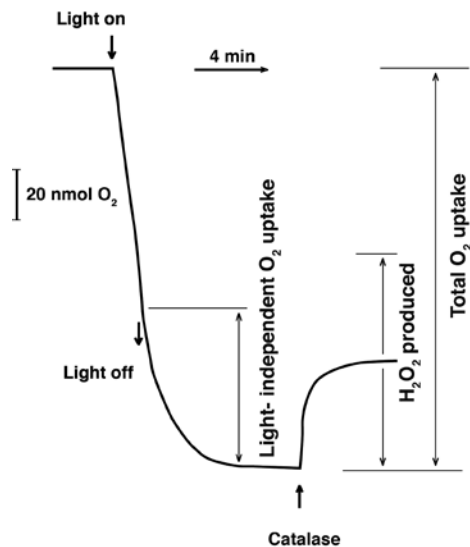


図 1 光増感剤存在下での Asc の光酸化による O<sub>2</sub>吸収酸素電極をもちいて Asc の酸化による O<sub>2</sub>吸収を測定した典型的な例を示す。1 ml の反応混液は、253 nmol O<sub>2</sub>, 20 mM リン酸緩衝液, pH 7.8, Asc, 増感剤として Rib を含む。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>量は 100 units カタラーゼ添加で生じる O<sub>2</sub>量を 2 倍して算出した。

度は Rib 濃度に比例して増加したが、10 μM 以上の Rib 濃度ではほぼ一定になった。(図 2 A)。なお、酸素電極の 1 ml 反応槽内には、光照射前に 253 nmol O<sub>2</sub> (25°C) が存在していたことから、O<sub>2</sub>吸収速度が一定になったのは反応槽内の酸素不足の為ではなく、反応性が高く不安定な <sup>3</sup>Rib\* と反応する O<sub>2</sub>の拡散が律速になるためであると考えられる。なお、光増感剤が存在しない場合は、光照射による Asc の O<sub>2</sub>吸収は生じなかった (図 2 A)。

### Asc 光酸化の Asc 濃度依存性

Asc 光酸化の Asc 濃度依存性を光依存性 O<sub>2</sub>吸収速度で検討した (図 2 B)。Rib の濃度を 12.5 μM に固定し、Asc 濃度を 0 から 1 mM までに変化させ、15,000 lx で光照射した。Asc の濃度を増加させると、O<sub>2</sub>吸収速度は増加したが、その割合は徐々に減少し、1 mM 以上ではほぼ一定になった。Asc が存在しないと、O<sub>2</sub>吸

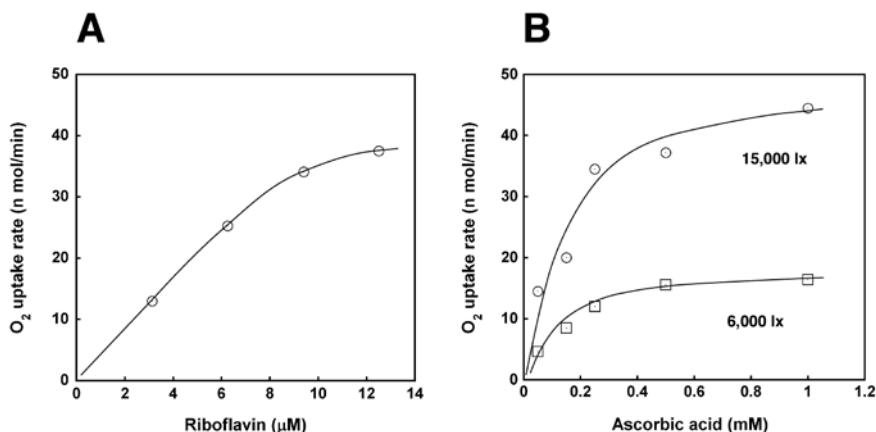


図2 Asc光酸化のRib濃度依存性およびAsc濃度依存性

反応混液は図1と同様。(A) Rib濃度依存性。[Asc] = 0.5 mM; 光強度, 15,000 lx (B) Asc濃度依存性。[Rib] = 12.5 μM

収が生じなかったことから, Rib存在下でのO<sub>2</sub>吸収にはAscが必要であることが示された。照射量が6,000 lxの場合, O<sub>2</sub>吸収速度は0.5 mM Ascで飽和し, 光強度が異なると, 飽和するAsc濃度も異なることが示された。このことは生成する短寿命の<sup>3</sup>Rib\*の存在量が光強度に比例することで説明できる。

#### Rib存在下でのAsc光酸化におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成およびO<sub>2</sub>吸収に対する光強度の影響

Ascの光酸化によるO<sub>2</sub>吸収速度およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成の光強度依存性を調べた(図3)。低濃度(1.25 μM)のRib存在下で, 0.5 mM Ascの光依存性O<sub>2</sub>吸収速度は, 調べた光強度範囲で直線的に増加した(図3 A)。一方, 光非依存性O<sub>2</sub>吸収は僅かしか認められず, 光強度30,000 lxで, 全O<sub>2</sub>吸収量に対する光非依存性O<sub>2</sub>吸収量の比は約0.1であった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成量は, 低光強度では光強度に比例したが, 10,000 lx以上になるとほぼ一定になり, 全O<sub>2</sub>吸収量に対する生成したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の比は, 最大0.5であった(図3 B)。

次に, 高濃度(12.5 μM)のRibを用いて同様に測定した。1.25 mM AscのO<sub>2</sub>吸収速度は光強度に依存して増加した(図3 C)。低濃度

Ribの場合と異なり, 全O<sub>2</sub>吸収量に対する光非依存性O<sub>2</sub>吸収量の比は光強度に比例して増加し, 30,000 lxでは全O<sub>2</sub>吸収量の約40%が光非依存性のO<sub>2</sub>吸収であった(図3 D)。これらのことから, 増感剤の濃度が高く, 光強度が強いと光非依存性O<sub>2</sub>吸収が増加することが示された。一方, 全O<sub>2</sub>吸収量に対する生成したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の比は, 低濃度のRib存在下の場合と同様な傾向を示し, 高濃度Rib存在下でも低濃度Rib存在下の値とほぼ同じ0.5であった(図3 D)。高濃度Rib存在下では光非依存性O<sub>2</sub>吸収の割合が増加することから, 光依存性O<sub>2</sub>吸収量に対する生成したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の比は1に近づくことが示された。

#### ローズベンガル存在下でのAsc光酸化におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成およびO<sub>2</sub>吸収に対する光強度の影響

RibはType IとType II反応の両方をおこなう光増感剤であるが, ローズベンガル(RB)は主にType II反応をおこなう光増感剤である。そこで, 比較のためにRBを用いてRibの場合と同様の測定をおこなった。0.125 μM RB存在下で, 0.5 mM Ascの光依存性O<sub>2</sub>吸収速度は調べた光強度範囲で直線的に増加した(図4 A)。全O<sub>2</sub>吸収量に対する光非依存性O<sub>2</sub>吸収量の比

光励起リボフラビンによるアスコルビン酸からのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成機構

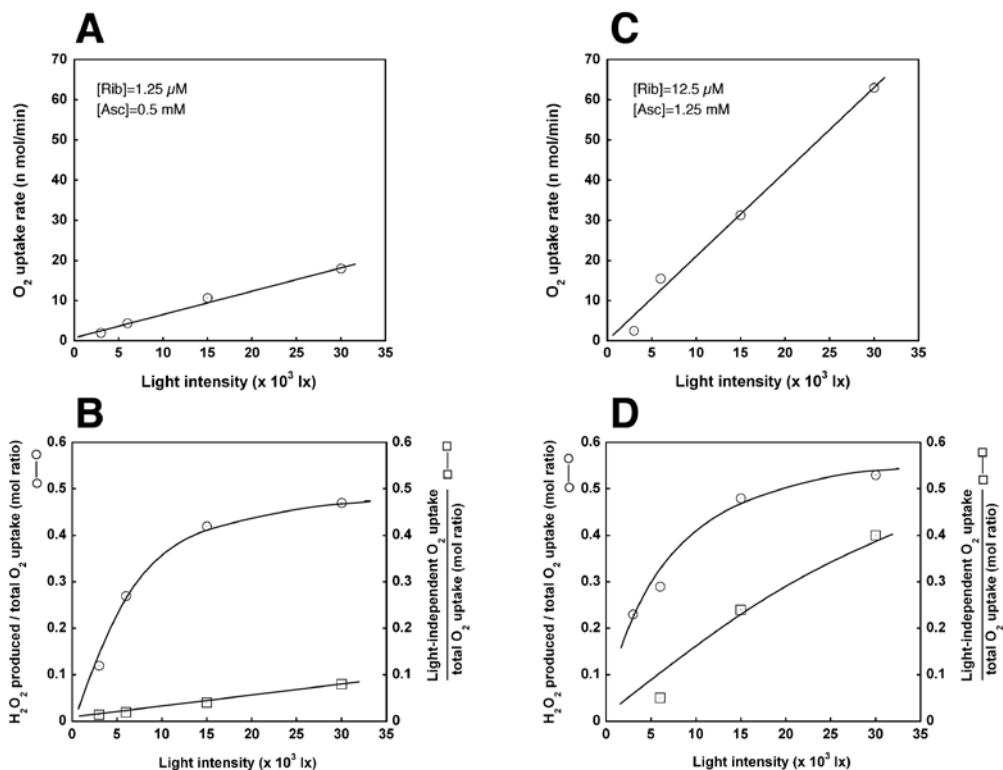


図3 Rib存在下でのAsc光酸化におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成およびO<sub>2</sub>吸収に対する光強度の影響

反応混液は図1と同様。(A) O<sub>2</sub>吸収速度の光強度依存性。[Rib]=1.25 μM, [Asc]=0.5 mM (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成量/全O<sub>2</sub>吸収量のモル比, および光非依存性酸素吸収量/全O<sub>2</sub>吸収量のモル比の光強度依存性。RibとAscの濃度は(A)と同様。(C) O<sub>2</sub>吸収速度の光強度依存性。[Rib]=12.5 μM, [Asc]=1.25 mM (D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成量/全O<sub>2</sub>吸収量のモル比, および光非依存性O<sub>2</sub>吸収量/全O<sub>2</sub>吸収量のモル比の光強度依存性。RibとAscの濃度は(C)と同様。

は, 30,000 lxで約20%であった。しかしながら, 全O<sub>2</sub>吸収量に対する生成したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の比は, 光強度依存性がなく, 0.45とほぼ一定であった(図4B)。この結果は, 低濃度のRBでは吸収されたO<sub>2</sub>は全て<sup>1</sup>O<sub>2</sub>に変換され, 次にAscと反応してH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生じることを示している。したがって, <sup>3</sup>RB\*とO<sub>2</sub>のエネルギー移動反応は効率的であり, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>とAscの反応も速やかにおこなわれると推測される。

1.25 μM RB存在下でも, 0.5 mM Ascによる光依存性O<sub>2</sub>吸収速度は光強度に依存して直線的に増加した(図4C)。全O<sub>2</sub>吸収量に対する光非依存性O<sub>2</sub>吸収量の割合は, 光強度とも

に増加し, 30,000 lxで全O<sub>2</sub>吸収量の約70%が光非依存性のO<sub>2</sub>吸収であった(図4D)。一方, 全O<sub>2</sub>吸収量に対する生成したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の割合は, 光強度に比例して増加し, その後, 60%と一定になった(図4D)。この時, 全O<sub>2</sub>吸収量の半分以上が光非依存性O<sub>2</sub>吸収量であることから, 光依存性O<sub>2</sub>吸収量に対するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の比は約1となる。この結果は, 高光強度での高濃度Ribの結果(図3D)と一致する。

#### Asc光酸化に対する<sup>1</sup>O<sub>2</sub>消光剤とSODの影響

Ascの光酸化におけるType II反応の関与の度合いを検討するために, O<sub>2</sub>吸収に対する<sup>1</sup>O<sub>2</sub>

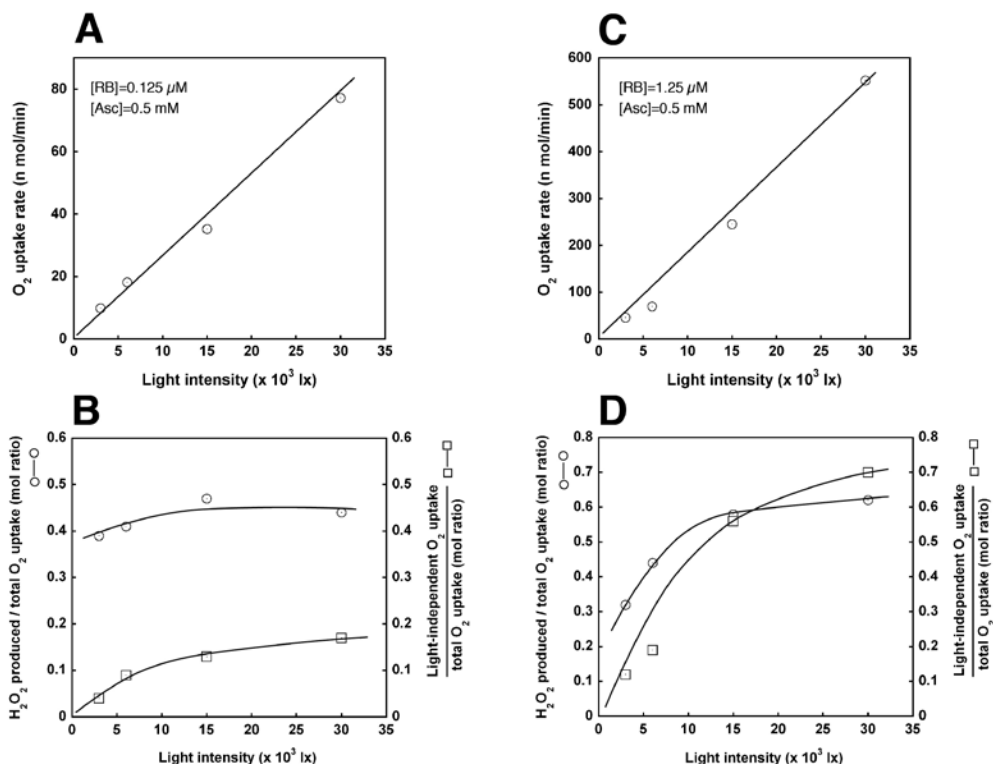


図4 RB存在下でのAsc光酸化におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成およびO<sub>2</sub>吸収に対する光強度の影響

反応混液は図1と同様。(A) O<sub>2</sub>吸収速度の光強度依存性。[RB]=0.125 μM, [Asc]=0.5 mM (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成量/全O<sub>2</sub>吸収量のモル比, および光非依存性O<sub>2</sub>吸収量/全O<sub>2</sub>吸収量のモル比の光強度依存性。RibとAscの濃度は(A)と同様。(C) O<sub>2</sub>吸収速度の光強度依存性。[RB]=1.25 μM, [Asc]=0.5 mM (D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成量/全O<sub>2</sub>吸収量のモル比, および光非依存性O<sub>2</sub>吸収量/全O<sub>2</sub>吸収量のモル比の光強度依存性。RBとAscの濃度は(C)と同様。

の消光剤であるN<sub>3</sub><sup>-</sup>とDABCOの影響を検討した(図5)。予想されたように, 1 mM N<sub>3</sub><sup>-</sup>はO<sub>2</sub>吸収速度を約80%阻害した。一方, 10 mM DABCOはほとんど阻害しなかった。Ascの代わりにTEMEDを用いたところ, 1 mM N<sub>3</sub><sup>-</sup>と10 mM DABCOはO<sub>2</sub>吸収速度を90-95%阻害した(図5)。

Ascの光酸化は主にType II反応であることが示唆されたが, Type I反応の関与の可能性をSODを用いて検討した(表1)。Rib存在下, 0.5 mMおよび1.0 mM Asc光酸化のO<sub>2</sub>吸収速度は, SODを加えることによって, それぞれ半分になった。一方, O<sub>2</sub>吸収量とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成量はSOD有無に関わらず同じであり, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>

比は0.5であった(表1)。

#### Ascの完全酸化で生じたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の化学量論関係

Ascと, Ascの光酸化で生じたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との化学量論関係を明らかにするために, 酸素電極の反応槽の蓋を開放し, スターラバーで攪拌することによって酸素を供給しながら, Rib存在下で光照射を10分間, 20分間, および30分間おこなった。照射終了後, 反応槽の蓋を閉じ, 生じたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>量をカタラーゼを加えて発生するO<sub>2</sub>量を測定することで算出した。1 mlの反応液中に100 nmol Ascを用いた結果を表2に示す。12.5 μM Rib存在下, 20分間の15,000 lx光照射で, 約200 nmolのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成が認められた。

光励起ポフラビンによるアスコルビン酸からのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成機構

表 1 Asc光酸化に対するSODの影響

Addition	O <sub>2</sub> uptake rate (n mol/min)	O <sub>2</sub> uptake amount (n mol)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> produced (n mol)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / O <sub>2</sub> (mol ratio)
0.5 mM Asc	58.6	155.9	71.8	0.46
0.5 mM Asc + 10 μg SOD	32.1 (54.8%)	146.2 (93.8%)	80.0 (111%)	0.55
1.0 mM Asc	57.9	162.1	84.1	0.52
1.0 mM Asc + 10 μg SOD	36.3 (62.3%)	154.5 (95.3%)	89.7(107%)	0.58

15,000 lx; [Rib]=12.5μM; 1 ml reaction mixture (closed)

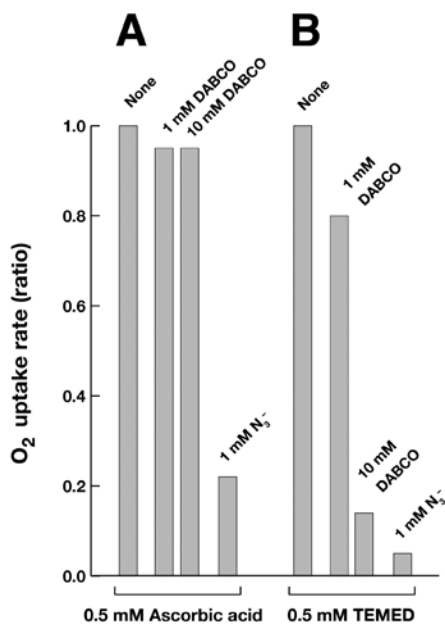


図 5 Asc 光酸化のO<sub>2</sub>吸収速度に対する<sup>1</sup>O<sub>2</sub>消光剤の影響

1 ml の反応混液は、20 mM リン酸緩衝液、pH 7.8、0.5 mM の Asc または TEMED、12.5 μM Rib を含む。光強度は15,000 lx。光依存性O<sub>2</sub>吸収の速度を測定した。

これらの結果より、Asc に対する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の化学量論比 2 が得られた。照射時間が10分間または30分間ではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascの比が小さくなったことから、最大値は約2であることが示された(表2)。

表 2 Asc と光酸化で生じたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の化学量論関係

Illumination time	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> produced / Asc (mol ratio)
10 min	1.3
20 min	1.9
30 min	1.7

15,000 lx; [Rib]= 12.5 μM; Asc=100 nmol in 1 ml open vessel

## 考 察

### 光依存性および光非依存性O<sub>2</sub>吸収

光増感 Rib による Asc の光酸化で、Type II 反応によって生じた<sup>1</sup>O<sub>2</sub>が Asc を直接酸化し、1:1 の化学量論比で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成することが報告されている<sup>7)</sup>。図 1 において、光依存性 O<sub>2</sub> 吸収量と生成した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量との間には 1:1 の化学量論関係が認められ、報告された結果と一致した。一方、照射後も光非依存性 O<sub>2</sub> 吸収が認められた(図 1)。全 O<sub>2</sub> 吸収量と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成量間でのモル比が約 2:1 であることから、光非依存性 O<sub>2</sub> 吸収は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成を伴わないことが示唆される。吸収された O<sub>2</sub> は O<sub>2</sub> 複合体を形成したと考えられるが、その分子種は不明である。

### <sup>1</sup>O<sub>2</sub>消光剤とSODの影響

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> の消光剤である N<sub>3</sub><sup>-</sup> が Asc 光酸化による O<sub>2</sub> 吸収速度を 80% 阻害したことから、O<sub>2</sub> 吸収の大部分は Type II 反応によることが示された



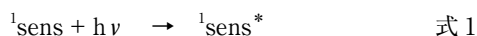
(図5A)。しかしながら、 $^1\text{O}_2$ の消光剤として知られているDABCOは $\text{O}_2$ 吸収を阻害しなかった。そこで、Ascの代わりにTEMEDを反応物として用いると $\text{O}_2$ 吸収速度は $\text{N}_3^-$ と同様、DABCOにより90%阻害された(図5B)。

TEMEDは励起Ribへの良好な電子供与体となるアミンであることが知られおり、Rib+TEMED+光の系はSOD活性測定系の $\text{O}_2^-$ 生成系<sup>12)</sup>として、また、ポリアクリルアミドゲルの重合開始剤<sup>13)</sup>として用いられる。したがって、ここで用いたRib+Asc+光の系でも $\text{O}_2^-$ の生成が考えられる。実際、この系に $\text{O}_2^-$ の検出系としてNBTを用いてSODによるNBT還元への阻害の有無を検討したところ、 $\text{O}_2^-$ の生成が検出できた(データ未掲載)。また、SODがAsc光酸化での $\text{O}_2$ 吸収に対して $\text{O}_2$ 吸収速度を半減させたことから、Type I反応も関与していることが示唆された(表1)。しかしながら、 $\text{N}_3^-$ がRib+TEMED+光の系での $\text{O}_2$ 吸収をほぼ完全に阻害したことから(図5B)、Ascの光酸化には主にType II反応で生じる $^1\text{O}_2$ が関与していることが示唆された。なお、Ascの光酸化の場合、DABCOの阻害が見られなかった理由として、 $^1\text{O}_2$ とAscの反応が $^1\text{O}_2$ とTEMEDの反応より速く、 $\text{N}_3^-$ に比較して分子サイズの大きいDABCOは短寿命( $10^{-5}$ 秒)<sup>6)</sup>の $^1\text{O}_2$ に十分接近できなかったためであると考えられる。

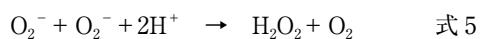
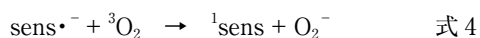
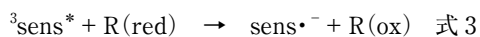
### 光増感反応の化学量論と $\text{H}_2\text{O}_2$ の生成機構

Ascの光酸化における $\text{H}_2\text{O}_2$ 生成の化学量論関係を明らかにするために、まず、一般的な光増感反応の化学量論関係を次式に示す<sup>4, 5)</sup>。光増感剤( $^1\text{sens}$ )は基底状態が一重項状態であるが、光照射によって励起されると励起一重項増感剤( $^1\text{sens}^*$ )になり(式1)、直ちに系間交差(ISC)によって準安定な励起三重項増感剤( $^3\text{sens}^*$ )に変換される(式2)。この $^3\text{sens}^*$ は三重項状態の化合物に対して高い反応性をもち、Type Iおよび/またはType IIの2つの異なる反応をおこなう。Type I反応では、 $^3\text{sens}^*$ が反応物(R)

との間で水素原子または電子転移をおこない、増感剤のアニオンラジカル( $\text{sens}\cdot^-$ )が生じる(式3)。分子状酸素(三重項酸素、 $^3\text{O}_2$ )が存在すると、 $\text{sens}\cdot^-$ からの1電子転移により、スーパーオキシド( $\text{O}_2^-$ )が生成する(式4)。その結果、 $\text{O}_2^-$ の自発的不均化反応により $\text{H}_2\text{O}_2$ が蓄積する(式5)。一方、Type II反応では、 $^3\text{sens}^*$ から $^3\text{O}_2$ へのエネルギー転移により、反応性が高い一重項酸素( $^1\text{O}_2$ )が生じる(式6)。一般に、量子収率はType IよりType IIの方が高い。



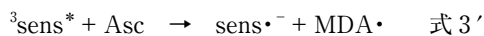
Type I反応の場合、



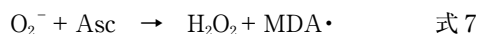
Type II反応の場合、



次にRがAscである場合の化学量論関係を示す。Type I反応では式3が



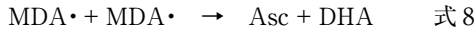
となり、生じた $\text{sens}\cdot^-$ は $^3\text{O}_2$ を還元して $\text{O}_2^-$ を生じる(式4)。Asc存在下では、 $\text{O}_2^-$ の自発的不均化反応の二次速度定数( $10^5 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ , pH 7.8)<sup>14)</sup>よりも、 $\text{O}_2^-$ によるAscの酸化反応の二次速度定数( $8.2 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ )<sup>15)</sup>の方が大きいことから、次の反応でモノデヒドロアスコルビン酸ラジカル(MDA $\cdot$ )が生じる(式7)。



式3'と式7のMDA $\cdot$ ラジカルは自発的不均化反応をおこない、Ascとデヒドロアスコルビ

光励起リボフラビンによるアスコルビン酸からのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成機構

ン酸 (DHA) が生じる<sup>16)</sup> (式 8)。



また、Type II反応では、次式が加わる<sup>6)</sup>。

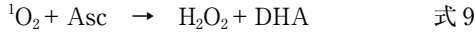


図6にAscの光酸化の反応スキームを示した(黒文字部分)。このスキームより求めたType IとType IIにおけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>モル比とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascモル比はType IではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> = 1, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Asc = 1であり、Type IIでもH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> = 1, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Asc = 1であった。

一方、我々が得た値はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> = 0.5 (図3, 図4), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Asc = 2 (表2)であり、図6のスキームで得られた値とは一致しなかった。そこで、今回の結果を満足するスキームを検討した。Type I反応では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, Asc間の比を満足させるスキームを見出せなかった。なお、<sup>1</sup>O<sub>2</sub>消光剤の効果から、Asc光酸化は主にType II反応が関与していると考えられることから、

Type I反応の化学量論関係への寄与は無視できると思われる。一方、Type II反応では、2分子の<sup>1</sup>O<sub>2</sub>が1分子のAscから連続して4電子を引き抜くことで2分子のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が生成すると仮定すると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Asc = 2 (表2)になる。この場合、最初のAscの酸化の結果、DHAが生じ、次に、DHAが再度酸化されることになる。さらに、過度に酸化されたDHAが2分子のO<sub>2</sub>と複合体を生成するとすれば、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> = 0.5 (図3B)も満足させることができる(図6赤文字部分)。Ascの光酸化反応では、光照射後に光非依存性のO<sub>2</sub>吸収があり、取り込まれたO<sub>2</sub>分子はカタラーゼでO<sub>2</sub>に変換できないことから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成を伴わないことが示され、したがってO<sub>2</sub>との複合体形成が示唆される。しかしながら、現在のところ、Ascの酸化・分解産物については明らかでないことから、今後、検討する必要がある。

今回の研究で、Ascは光励起RibのType II反応によって、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成することが示され

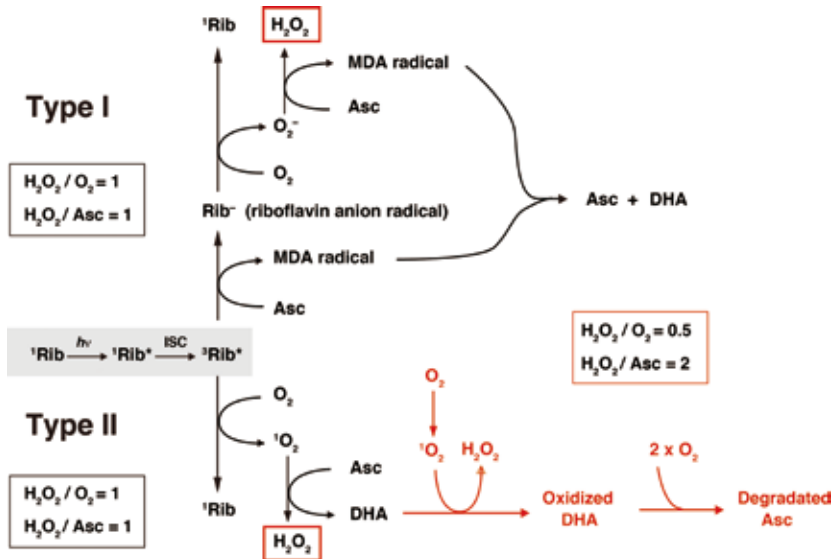


図6 Type I および Type II 光増感反応の化学量論関係と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成機構

(黒文字)：Asc存在下でのType IおよびType II反応を表している。この反応スキームから得られるType IおよびType IIの化学量論値を黒括弧内に示す。(赤文字)：新たに副次的な反応を加えると、今回得られた化学量論関係(赤括弧)を満足する。

た。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は生体にとって有毒であるが、食品中でも食品成分である光増感剤と電子供与体の意図しない混合でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成が起こる可能性がある。したがって、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生じさせる食品中の光増感作用を有する成分と電子供与が可能な成分を調べることは重要である。

### 参考文献

- 1) スポーツ庁 (2017) 「スポーツの実施状況等に関する世論調査 (平成28年11月調査)」  
[http://www.mext.go.jp/sports/b\\_menu/toukei/chousa04/sports/1381922.htm](http://www.mext.go.jp/sports/b_menu/toukei/chousa04/sports/1381922.htm)
- 2) 産業経済省 (2012) 「清涼飲料の生産動向等について」  
<http://www.meti.go.jp/committee/download-files/g40804b070j.pdf>
- 3) Choe, E., Huang, R. and Min, D.B. (2005) Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. *J. Food Sci.* 70: R28-R36.
- 4) Foote, C. S. (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 54: 659.
- 5) Min, D.B. and Boff, J.M. (2002) Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1: 58-72.
- 6) 浅田浩二 (1976) 「酸素毒性」*生化学* 48: 226-257.
- 7) Kramarenko, G.G., Hummel, S.G., Martin, S.M. and Buettner, G.R. (2006) Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. *Photochem. Photobiol.* 82: 1634-1637.
- 8) 厚生労働省 (2016) 「食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について」  
<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000141201.pdf>
- 9) DeSesso, J.M., Lavin, A.L., Hsia, S.M. and Mavis R. D. (2000) Assessment of the carcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide. *Food Chem. Toxicol.* 38: 1021-1041.
- 10) Ito, A., Watanabe, H., Naito, M., Naito, Y. and Kawashima, K (1984) Correlation between induction of duodenal tumor by hydrogen peroxide and catalase activity in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 75: 17-21.
- 11) Kanematsu, S. and Asada, K. (1990) Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiol.* 31: 99-112.
- 12) Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
- 13) Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- 14) Kanematsu, S. and Asada, K. (1994) Superoxide dismutase. *In* *Molecular Aspects of Enzyme Catalysis*. Edited by Fukui, T and Soda, K. pp.191-210, Kodansha/VHC, Tokyo.
- 15) Nandi, A. and Chatterjee, I.B. (1987) Scavenging of superoxide radical by ascorbic acid. *J. Biosci.* 11: 435-441.
- 16) Asand, H. (2007) Ascorbate. *In* *Redox Biochemistry*. Edited by Banerjee, R., et al. p.23, Wiley-Interscience.