

パプラール製剤に含まれる白金および パラジウムコロイドと溶存酸素および ヒドロキシルラジカルの反応

京都工芸繊維大学大学院 生体分子工学部門

田嶋 邦彦 櫻井 康博 大石 俊恵

金折 賢二

安田女子大学 薬学部

森本 千恵

安田女子大学 家政学部

坂本 俊治

キーワード：パプラール製剤，白金，パラジウム，コロイド，水素，溶存酸素濃度，
ヒドロキシルラジカル消去活性，ESR，スピントラッピング

緒 言

ヒドロキシルラジカル消去活性を維持あるいは改善するために，抗酸化活性を備えた医薬品あるいは食品などが注目され，それらの抗酸化活性について物理化学的な研究が継続されている^{1~3)}。溶存水素によるヒドロキシルラジカルの消去反応が注目を集めている⁴⁾。溶存水素とヒドロキシルラジカルの反応速度定数は $6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 程度であり，その反応速度は比較的遅いが，無毒な溶存

水素の血中投与あるいは吸引などによる供給が検討されている⁵⁾。水素原子は溶存水素に比べてヒドロキシルラジカルとの反応が速い ($k_s \sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁶⁾ ことが知られている。水溶液中で溶存水素を水素原子に変換する機構として，白金あるいはパラジウムなどの金属固体表面における水素分子の吸着と水素原子への活性化がある。白金およびパラジウムの金属コロイド溶液であるパプラール製剤は原液 (3.0mL) 中にコロイド状の白金 0.6mg とパラジウム 0.9mg を含み，コロイド表面に吸着した水素によってヒドロキシルラジカルを

Chemical Reactivity of Pd-, and Pt-colloid Involved in Papuraru to Solvated Oxygen and Hydroxyl Radical

Kunihiko TAJIMA (Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan) et al.

消去する機能を有している⁷⁾。パプラーン製剤のPtコロイドの粒径はおおよそ50 Å, Pdコロイドの粒径はおおよそ100 Åであり, その主な効能は急性胃炎および胃粘膜損傷に対する効果である⁸⁾。パプラーン製剤は, ヒドロキシルラジカルに対して優れた消去活性を有し, その重量あたりの消去活性はビタミンCに匹敵する⁹⁾。

本研究では, パプラーン製剤とヒドロキシルラジカルおよび溶存酸素との反応を研究し, それらの反応におけるPtおよびPdコロイドの作用機序を検討した。前者のヒドロキシルラジカルの消去活性はフローインジェクションESR装置 (FI-ESR)³⁾ を使用して検討した。さらに, 後者の溶存酸素との反応は, 電気化学検出法による溶存酸素濃度の時間変化を計測した。本論文では, Ptコロイドがヒドロキシルラジカル消去活性について中心的な役割を果たし, PdコロイドはPtコロイドの溶存酸素による酸化的な失活を抑制する作用を有することを報告する。

実 験

1. 試 薬

パプラーン製剤の原液 (1.0 mL中にPdコロイド0.3 mg, Ptコロイドの白金0.2 mg) を開封直後に測定に使用した。さらに, パプラーン製剤の原料である, 単独のPdコロイド溶液 (0.6 mg/mL) およびPtコロイド溶液 (0.4 mg/mL) を測定に使用した。パプラーン製剤および両コロイド溶液は東洋厚生製薬所から提供された。5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO) は市販の試薬 (Labotech) を精製せずにそのまま測定に使用した。DMPOおよび過酸化水素の水溶液は, 超純水を使用して大気中で調製した。ESR信号の強度補正にはTEMPOL (2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine-N-oxyl, 和光純薬) をそのまま使用した。いずれの試薬及び測定溶液も測定の直前に所定の濃度に調製した。

2. FI-ESR測定および溶存酸素濃度の測定

FI-ESR測定にはTE-100 型電子スピン共鳴装置 (日本電子) に改良型IPRITソフトウェアと組

み合わせてして使用した。FI-ESR測定システムは高速液体クロマトグラフ分析用 (TOSOH) の送液ポンプ, 6方切り替えバルブ, インジェクションバルブおよび扁平型石英ESRフローセル (Wilmad) で構成され, これらを通常のHPLC用のPEEKチューブ (外径1.58 mm, 内径0.13 mm) で接続した。光照射には, 石英ガラスとテフロンスプレーサーで構成されるフロー型の照射セル (JEOL) を使用し, 紫外線照射には光ファイバー式照射装置 (三永電機, UV-203S, 150 W) を使用した³⁾。DMPO/OHラジカルの濃度は, 安定ラジカルであるTEMPOL (和光純薬) のESR信号強度と濃度の検量線から評価した。また, 磁場掃引形式で観測するESR信号の強度補正には外部標準試料として酸化マグネシウムに希釈したMn(II)イオンを使用し, 磁場強度の補正にはMn(II)イオン由来のESR信号の低磁場から3本目と4本目の分裂幅 (8.69 mT) を基準とした。なお, FI-ESR法における信号強度の実験誤差は±5%以内である。溶存酸素濃度の測定にはTD-51型微量溶存酸素計 (東興化学研究所) を使用した。溶存酸素濃度のゼロ点補正には亜硫酸水素ナトリウムの飽和溶液を使用した。また, 大気を連続的に通気した超純水の溶存酸素濃度 (8.11 mg/mL) を基準として測定値を校正した。

結 果 と 考 察

1. PtおよびPdコロイド溶液およびパプラーン製剤の酸素吸収挙動

パプラーン製剤の主成分であるPtおよびPdコロイドと溶存酸素の反応を電極法で観測した (Fig. 1-1)。あらかじめ空気を通気した蒸留水 (1.2 mL) の溶存酸素量は約8.1 mg/mLであるが, 水素ガスで置換した0.4 mLのPtコロイド溶液を加えた混合溶液 (Pt, 0.10 mg/mL) の溶存酸素濃度は1分以内でほぼゼロに達した。このとき, Ptコロイドが吸収した溶存酸素量は9.96 mgである。次に, 同様にして0.4 mLのPdコロイド溶液を1.2 mLの空気飽和した超純水に混合すると (Pd, 0.15 mg/mL), 溶存酸素濃度は1分以内に3.6 mg/mLの一定値に達し, このPdコロイド溶液が吸収

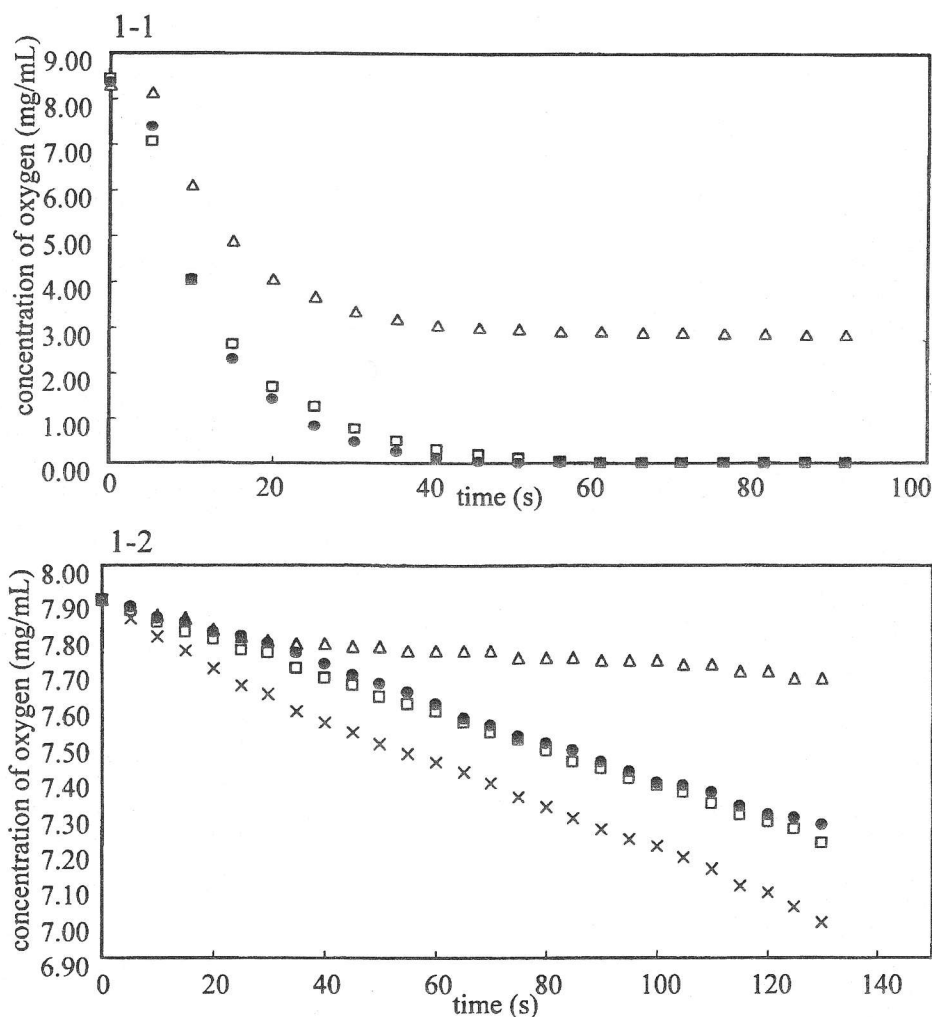


Figure 1 Time dependence of solvated oxygen concentration (mg/mL) of colloidal solutions observed before aeration (1-1) Pd colloid (Δ : Pd, 0.15 mg/mL), Pt colloid (\square : Pt, 0.10 mg/mL), and papuraru (\bullet : Pt, 0.10 mg/mL and Pd, 0.15 mg/mL), and after aeration (1-2) \times , sum of the oxygen consumption by Pd and Pt colloids. The concentration of Pd and Pt colloids was equal to that of papuraru.

した溶存酸素量は4.20mgである。この結果は、パプラー製剤に含まれるPtコロイドはPdコロイドに比べて溶存酸素を効果的に吸収することを示唆している。ここで比較のために、パプラー製剤の原液0.8mlを空気飽和した超純水0.8mLに混合すると (Pdコロイド0.15mg/mL, Ptコロイド0.1mg/mL), 混合から約1分以内に溶存酸素濃度はほぼ0に達し、その時間変化は先に述べたPtコロイドと類似していた。一般に、金属コロイド

粒子の性質はその粒子径、表面状態および溶存酸素濃度等の影響を受けるため、PtおよびPdコロイドの酸素親和性を定量的に議論することは困難である。ここで、パプラー製剤の主成分であるPtおよびPdコロイドの酸素親和性を比較する限り、酸素吸収量のほとんどはPtコロイドに依存していることが結論できる。

次に、これら単独のPdおよびPtのコロイド溶液の溶存酸素濃度が8.0mg/mLに達するまで空気

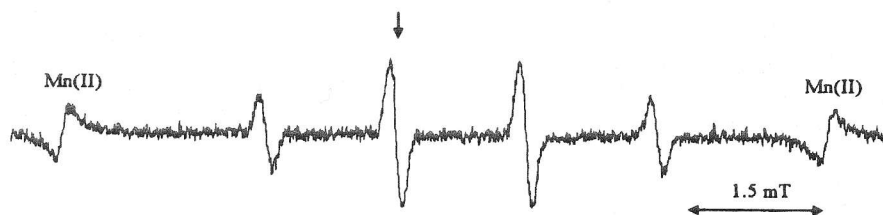


Figure 2 ESR spectrum observed for DMPO/OH radical.

The downward arrow indicates the static field for FI-ESR measurements.

を充分に通気し、その後の酸素濃度の時間変化を記録した (Figure 1-2)。単独のPtコロイド溶液 (0.1mg/mL) の場合、酸素ガス通気を停止した後に、溶存酸素濃度は徐々に低下し、約120秒後に酸素濃度は約7.22mg/mLに減少した。他方、単独のPdコロイド溶液 (0.15mg/mL) の溶存酸素吸収はPtに比べて遅く、約120秒後に溶存酸素濃度は約7.70mg/mLまで減少した。これらの酸素飽和状態における酸素吸収は、前述の水素ガス置換したコロイド溶液の酸素吸収に比べて特徴的に遅い。興味深いことに、この遅い酸素吸収の挙動は水素置換したPdコロイド溶液およびパプラー製剤について観測された、1分以降の遅い酸素吸収の挙動とほぼ一致している。これは、この遅い溶存酸素の消費過程は、PtおよびPdコロイドに比べて十分な溶存酸素が存在する場合に観測される現象である可能性を支持している。また、この遅い過程の酸素吸収量はコロイド濃度に依存することから (data not shown)、金属コロイドが溶存酸素を消費する可能性を示唆している。したがって、この遅い溶存酸素の消費は金属コロイドの酸化失活過程に関連した反応として考えることができる。

次に、パプラー製剤の2倍希釈溶液 (Pdコロイド0.15mg/mL, Ptコロイド0.1mg/mL) についても充分に空気を通気後の溶存酸素濃度の時間変化を記録した (Figure 1-2)。測定開始から溶存酸素濃度は単調に減少し、約120秒後における溶存酸素濃度は約7.15mg/mLであった。溶存酸素濃度の時間変化は単独のPtコロイド溶液の観測結果に類似している。また、見かけの酸素濃度の

減少速度はPdが最も遅く (約0.1mg/mL・min)、Ptとパプラー製剤がほぼ等しく約0.5mg/mL・minであった。試みとして、単独のPtおよびPdコロイドの酸素消費量を加算して、パプラー製剤と組成比が等しい仮想的な溶液の溶存酸素濃度の時間変化をプロットすると (Figure 1-2)、その酸素濃度は組成が同じパプラー製剤の観測結果を有意に下回る傾向が認められた。これは、パプラー製剤に含まれるPdとPtコロイドは溶液中で相互作用し、結果的に溶存酸素の吸収を抑制した可能性を示唆している。酸素吸収をコロイド金属の酸化失活と考えると、この観測結果はパプラー製剤で共存するPdコロイドは、Ptコロイドの酸化失活を抑制する効果を有することを意味している。

2. PtおよびPdコロイド混合比率のヒドロキシルラジカル消去活性

流通型電子スピン共鳴法 (FI-ESR) によって、混合組成の異なるPtおよびPdコロイド混合溶液のヒドロキシルラジカル消去活性を検討した。DMPOをスピントラッピング試薬として使用し、DMPOのヒドロキシルラジカルアダクト (DMPO/OH) のESR信号を測定対象とした。過酸化水素の紫外線照射で生成するヒドロキシルラジカルをDMPO/OHラジカルとして検出した。Figure 2に示したESRスペクトルは、HPLCポンプから連続的に送液する超純水 (1.0mL/min) にインジェクションバルブからDMPO (100 μ M) と過酸化水素 (500mM) の混合溶液 (以下、コントロール溶液とする) を注入 (0.2mL) し、反応溶液がESRセ

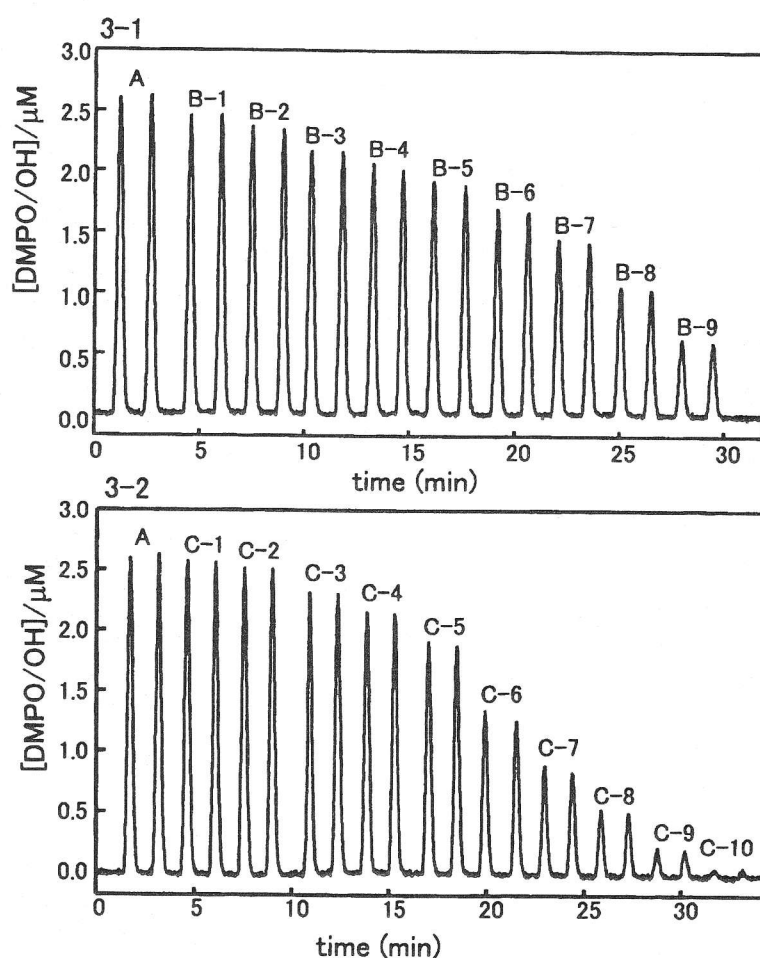


Figure 3 FI-ESR signals of DMPO/OH radical observed for each injection of reaction mixture containing DMPO (100 μ M), H_2O_2 (500 μ M) and diluted (0.05% to 1.0%) colloidal solutions. (3-1) FI-ESR signal observed for control solution (A), and diluted colloidal solution of (Pt 0.04 mg/mL, Pd 0.3 mg/mL), B-1, 0.03 %; B-2, 0.05 %; B-3, 0.08 %; B-4, 0.10 %; B-5, 0.12 %; B-6, 0.15 %; B-7, 0.20 %; B-8, 0.30 %; B-9, 0.50 %. (3-2) FI-ESR signal observed for control solution (A), and diluted colloidal solution of (Pt 0.2 mg/mL, Pd 0.06 mg/mL), C-1, 0.005 %; C-2, 0.01 %; C-3, 0.03 %, C-4, 0.05 %; C-5, 0.10 %, C-6, 0.15 %; C-7, 0.20 %; C-8, 0.30 %; C-9, 0.50 %. FI-ESR measurements were conducted by following condition; microwave power 10 mW, modulation width 0.16 mT, amplitude 1000, time constants 1.0 ms, sampling interval 1.0 ms, and number of accumulation 1000.

ルに到達した時点で送液を停止して外部磁場を掃引して記録した。ESR信号は強度比1 : 2 : 2 : 1の4本線の微細分裂 ($a^H = a^N = 1.50$ mT) を示し、その信号の線形と微細結合定数から、本ラジカルをDMPO/OHラジカルと帰属した。次に、DMPO/OHラジカルのESR信号の低磁場から2本目のピー

ク頂点に磁場を固定し、HPLCポンプから超純水を毎分1.0 mLで連続的に送液しながら、インジェクションバルブからコントロール溶液を注入すると、DMPO/OHラジカルの信号強度の時間変化曲線が観測された (Figure 3-1)。TEMPOLラジカルのESR信号強度を基準として、コントロール溶

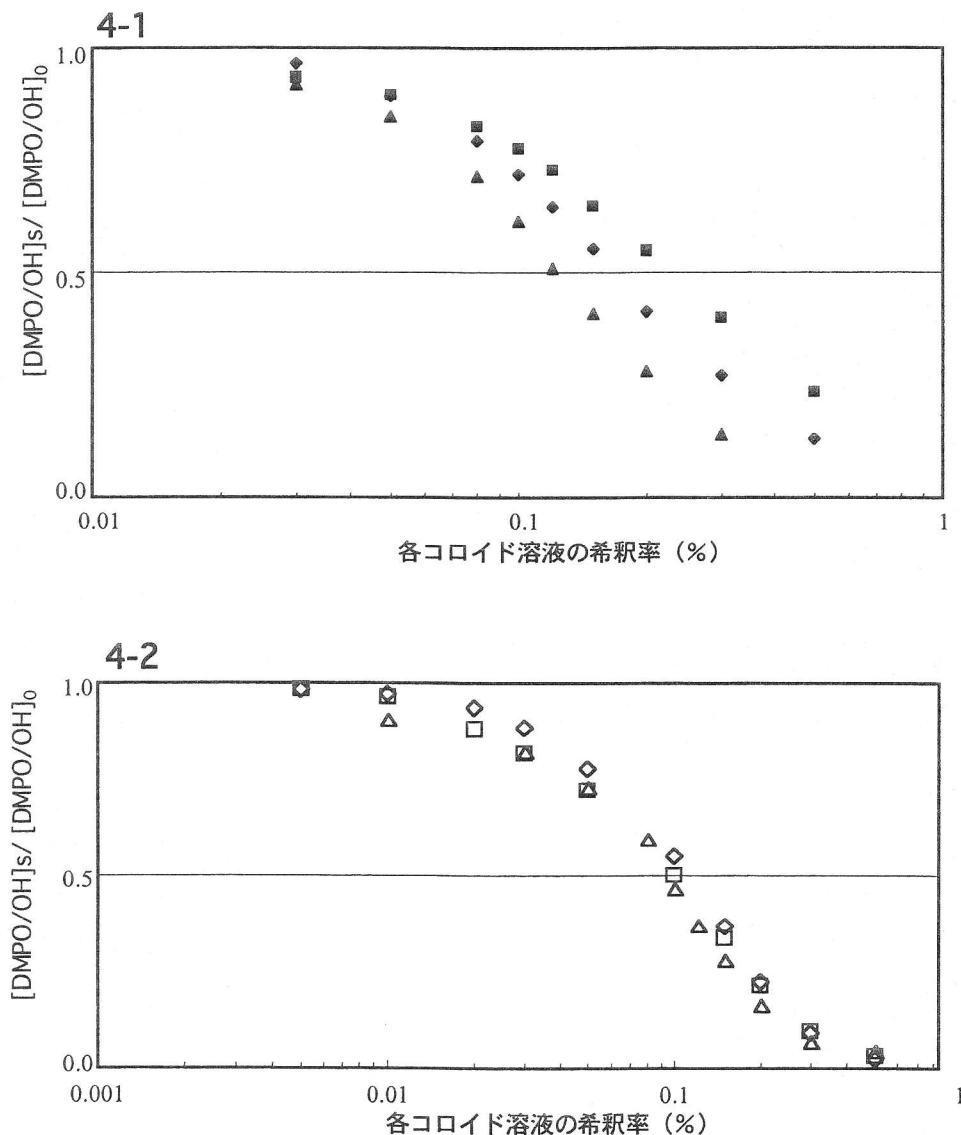


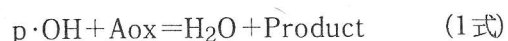
Figure 4 Inhibitory curves of mixed solutions of Pd and Pt colloid. (4-1) ■ mixed solution composed of Pd (0.3 mg/mL) and Pt colloid (0.04mg/mL), ◆ Pd (0.3 mg/mL) and Pt colloid (0.04mg/mL), and ▲ Pd colloid (0.3 mg/mL) and Pt colloid (0.1mg/mL); (4-2) □ mixed solution composed of Pd (0.15 mg/mL) and Pt colloid (0.2 mg/mL), ◇ Pd colloid (0.15 mg/mL) and Pt colloid (0.2 mg/mL), and △ Pd colloid (0.3 mg/mL) and Pt colloid (0.2mg/mL). The bottom horizontal axis corresponds to the dilution (%) of these mixed colloidal solutions.

液のDMPO/OHラジカルの濃度 ($[DMPO/OH]_c$) は $2.6 \mu M$ と解析した。

あらかじめ水素ガスを通気したPdコロイド (0.3 mg/mL) とPtコロイド (0.04mg/mL) の混合溶液を測定試料とし、空気で飽和した超純水で0.4%から0.02%に希釈した測定溶液についてFI-ESR測

定を行った (Figure 3-2)。純水で0.05%に希釈したコロイド溶液を含むコントロール溶液をFI-ESRシステムに注入すると、DMPO/OHラジカルの信号強度はコントロールの約90%に減少した。希釈率の低下につれて、DMPO/OHラジカルの強度は段階的に減少し、最終的に希釈率が0.5%の溶

液ではDMPO/OHラジカルの強度はコントロール溶液の約25%に減少した。コロイド溶液を加えた溶液のDMPO/OHラジカル濃度 ([DMPO/OH]_s) とコントロール溶液のDMPO/OH濃度 ([DMPO/OH]_c) との比率(%)を縦軸に、コロイド溶液の希釈率を横軸にとって抗酸化曲線をプロットした (Figure 4-1, ■ : Pd 0.3mg/mL, Pt 0.04mg/mL, ◆ : Pd 0.3mg/mL, Pt 0.1 mg/mL, ▲ : Pd 0.3 mg/mL, Pt 0.2mg/mL)。いずれもコロイド溶液もシグモイド型の線形を示し、見かけのID₅₀値はそれぞれ約0.14, 0.2および0.25%であり、Ptコロイドの濃度増加につれてID₅₀値が減少する傾向が顕著である、これは、ヒドロキシルラジカルの消去活性がPtの添加によって向上した結果である。さらに、抗酸化曲線の線形を比較すると、Pt濃度の低下につれてシグモイド曲線がなだらかになる傾向がある。シグモイド曲線の線形は競争反応の反応次数 (p) に依存して変化する。



たとえば、上式の反応ではp=2のシグモイド曲線の線形は、p=1に比べてなだらかになることがシミュレーション計算によって明らかである。PdおよびPtコロイド混合溶液の抗酸化曲線の線形は、Ptの存在比率が低下するにつれて、見かけの反応次数pが1を上回ることを示唆している。実際にPdコロイド (0.3mg/mL) およびPtコロイド (0.04mg/mL) 混合溶液の反応次数pは約2と解析された。この結果は、PdおよびPtコロイドの抗酸化活性機構を考えるうえで興味深い知見であり、今後の詳細な解析が期待される。

次に、同様の測定手順でPtコロイド溶液とPdコロイド溶液の混合溶液 (Pt, 0.2mg/mL, Pd, 0.06から0.3mg/mL) についてFI-ESR測定を行い、それぞれの抗酸化曲線をプロットした (Figure 4-2, □ : Pd 0.06mg/mL, Pt 0.2mg/mL, ◇ : Pd 0.15 mg/mL, Pt 0.2mg/mL, △ : Pd 0.3mg/mL, Pt 0.2mg/mL)。組成の異なるコロイド溶液の抗酸化曲線はほぼ重なり、ID₅₀値は0.1%から0.12%の範囲で一致した。この結果は、Pdコロイドの濃度

が増加しても見かけの抗酸化活性は、ほとんど変化しないことを意味している。また、抗酸化曲線のシグモイド曲線の線形もPd濃度と無関係に一致し、その線形から反応次数pはほぼ1と解析された。PtおよびPdコロイド溶液の混合溶液のヒドロキシルラジカルに対する抗酸化反応では、Ptコロイドが中心的な役割を果たしていることが明らかにされた。

結 論

あらかじめ水素置換したPd, Ptコロイド溶液およびパプラーン製剤は、急速な溶存酸素を吸収し、Ptコロイドの溶存酸素吸収量はパプラーン製剤にほぼ等しく、Pdコロイドを有意に上回る。さらに、3種類のコロイド溶液の水素を空気で置換すると、金属コロイドの酸化的な失活に伴う遅い溶存酸素濃度の低下が認められ、PtコロイドはPdコロイドに比べて溶存酸素による酸化を受けやすい。また、パプラーン製剤の溶存酸素吸収量と単独のPtおよびPdコロイド溶液の酸素吸収量の比較から、パプラーン製剤に含まれるPdコロイドはPtコロイドの酸化的な失活を抑制する効果を有する可能性が示唆された。FI-ESR法で評価したPdおよびPtコロイドのヒドロキシルラジカル消去活性の比較から、Ptコロイドの消去活性がPdコロイドの活性を上回ることが判明した。さらに、パプラーン製剤のヒドロキシルラジカル消去活性は単独のPtコロイドとほぼ等しいことから、パプラーン製剤のヒドロキシルラジカル活性は主にPtコロイドに起因することが結論された。以上の結果から、パプラーン製剤の安定性と優れた抗酸化活性は、共存するPtコロイドとPdコロイドに起因することが判明した。

謝 辞

パプラーン製剤、Ptコロイド溶液およびPdコロイド溶液をご提供頂いた株式会社東洋厚生製薬所の築地栄一社長に深謝します。