

カラムスイッチングセミマイクロHPLCによるリポキシゲナーゼ不活性化剤スクリーニング系の構築

高城 徳子¹, ○土田 和徳¹, 上野 光一², 輿石 一郎¹ (¹日本薬大, ²千葉大院薬)

【緒言】ラジカルスカベンジャーによるリポキシゲナーゼの阻害機構は低酸素条件下での Fe^{3+} -リポキシゲナーゼの Fe^{2+} -リポキシゲナーゼへの不活性化である。しかしながら、その不活性化能は Fe^{2+} -リポキシゲナーゼの活性部位に局在する多価不飽和脂肪酸アリルラジカルとの反応速度に依存する。本研究では、ラジカルスカベンジャーであるニトロキシルラジカルを基準物質として競合的阻害機構によるリポキシゲナーゼ不活性化剤のスクリーニング系を構築した。

【実験】ニトロキシルラジカル-リポキシゲナーゼ-多価不飽和脂肪酸混合系における脂肪酸アリルラジカル-ニトロキシルラジカル付加体の産生をカラムスイッチングセミマイクロHPLCによる検出系により評価した。

【結果及び考察】HPLCによるスクリーニング系としては、評価物質のピークが検出対象である脂肪酸アリルラジカル-ニトロキシルラジカル付加体のピークにかぶることを避けなくてはならない。そこで、スクリーニング系の条件を次の2点とした：①付加体よりも脂溶性の物質はプレカラムに吸着させた後、分離カラムに導入することなくカラムスイッチングにより洗い流す、②付加体と極性が極めて近い物質の妨害を受けることの無いように2種類の付加体を等量産生させる。まず、②については、ニトロキシルラジカルに $\text{Cm}\Delta\text{P}$ 、多価不飽和脂肪酸にリノール酸を用いることで、13- $\text{Cm}\Delta\text{P}$ -9Z,11E-ODE および 9- $\text{Cm}\Delta\text{P}$ -10E,12Z-ODE をほぼ等量産生させることが可能であった。①については、分離カラムに TSK-gel Super ODS (2.0 mm i.d. x 50 mm)、プレカラムに TSK-gel Super ODS (2.0 mm i.d. x 10 mm)を用いることで1検体10分以内に評価することが可能であった。また、本評価系の陽性対照としてプロブコールおよびエダラボンが有効であることを明らかにした。