

科学的思考力の育成を目指した学生主体の 化学実験プログラムの作成 —ラジカル消去率の測定による物質の抗酸化能の評価—

船山 智代*

The Making of a Chemistry Experiments Program by Students, Mainly with the Aim of Fostering Scientific Thinking: Evaluation of the Antioxidant Capacity of a Substance by Measurement of the Radical Scavenging Rate.

Tomoyo FUNAYAMA

要旨 科学的な概念や原理・法則に基づき、自然現象や事象について考え理解する科学的思考力は、自然に対する理解を深めるとともに、科学的リテラシーの向上にも繋がると考えられ、持続可能な社会を築いていく力になると期待される。そこで、学生の科学的思考力の育成を目標に、自然現象や事象の理解の過程を4段階に分け構成した学生主体の化学実験プログラムの作成を試みた。プログラムには、学生自身の自然に対する漠然とした興味を、その本質の興味へと学生自らが転換させる為の手立てとして「視覚化」を取り入れた。具体的な実験のテーマは、「ラジカル消去率の測定による物質の抗酸化能の評価」とし、ラジカル消去の化学現象を視覚化する実験系として DPPH ラジカルの反応に伴う吸光度の変化を測定する DPPH 法を、化学現象に関わる要因を考察する助けとして理論面では分子軌道計算による物質の電子状態の視覚化を取り入れた。DPPH 法は、ラジカル消去反応前後の溶液の色の変化が明瞭である為、ラジカル消去現象と物質の抗酸化能を結びつける手立てとして適していた。今後の課題は、定量的観点から、実験結果と理論計算より算出した物理量を対応させ、物質が示したラジカル消去の要因と消去機構の考察へとプログラムの内容を深めることである。

キーワード：科学的思考力 化学実験 抗酸化能 DPPH 法 フェノール酸

1. はじめに

現代におけるヒトの生活には食品、衣料品、家具、医薬品、電子機器端末等、様々なもの（物質）が溢れており、ヒトは常に物質に囲まれて暮らしていると言ってもよい。ヒトは、それら種々の物質が内包する性質を巧みに利用して生命を維持し、日々の生活に生かしている。物質が持つ性質

やその発現機構について理解することは、基礎学力としての科学的な原理や概念・法則の理解のみならず、科学的リテラシーの向上にも繋がると考えられる。文部科学省の資料¹⁾によると、OECD-PISA 調査において、「科学的リテラシーとは、自然界及び人間の活動によって起こる自然界の変化について理解し、意思決定するために、科学的知識を使用し、課題を明確にし、証拠に基づく結論を導き出す能力」であると定義され、その特徴として、「日常生活における様々な状況で

*ふなやま ともよ 文教大学教育学部学校教育課程理科専修

科学を用いることを重視していること」、「科学的プロセスに着目し把握しようとしていること」の2点が挙げられている。注目点は、判断が科学的論拠に基づくことである。客観的かつ論理的な科学的プロセスを経た判断と意思決定により、ヒトは自然界に存在する生物と共存し、共により良く生き、持続可能な社会を築いていくことが実現されうる。その為には、この科学的プロセス「科学的現象の記述、説明、予測、科学的探究の理解、科学的証拠と結果の解釈といったプロセスに分類し、把握すること」、つまり自然科学の基礎知識を踏まえた上で、自然を理解する為の方法論を身につけ、社会において活躍することが重要である。理科は、自然の理に基づいた科学的プロセスを学ぶのに適した教科である。

そこで私は、将来、理科の教員となることを希望する学生らが、自然の理に基づいた科学的プロセスを体験することを通して科学的思考力を身につけることが出来るよう、その一助となるべく、物質由来の化学現象を観察対象とし、科学的プロセスに基づく学生主体の化学実験プログラムを作成することにした。

「学生主体」とした理由は、自身の授業実践の経験に依る。私は、文教大学教育学部学校教育課程理科専修の3年生対象の「化学実験Ⅲ」の授業に、生命科学分野の実験テーマ「卵白タンパク質の分離・同定と天然物の定性分析」を作成、導入し、その内容について文教大学教育学部紀要第47集に報告した。²⁾ 実験プログラムは、卵白を構成するタンパク質を電気泳動で分離、染色し、ゲル上のバンドの位置から構成タンパク質分子を同定する内容である。その授業後に学生に配布した質問票の回答結果から、学生は、卵の構成物質を白身、黄身といった名称でとらえる意識が強く、実際に卵白のタンパク質分子が分離された実験結果が目前にあっても、「分子」の視点で卵白を理解することに必ずしも繋がらないことがわかった。私はその要因として、次の2つの理由を考えた。1つは、タンパク質は高分子化合物である為、

分子という概念で卵白を捉え難かったこと。もう1つは、課題への取り組みを強制されているといった意識が学生の内面にあり、それが対象物に対するモチベーションを下げ、結果として、物質を分子の視点で捉えるといった概念の転換を妨げたのではないかということである。学生との対話からは、学生は物質に興味を持っていると思われた。そこで、学生がもつ物質に対する興味を、物質の持つ本質の興味へと学生自身が転換させる手立てを含んだ実験プログラムを提供することで、学生は、物質について分子レベルで捉える視点を学び得て、それが科学的思考力を育成することに繋がるのではないかと考えた。

「物質」に主眼をおいた理由は、科学領域において化学は物質の科学とも呼ばれ、物質および物質由来の化学現象を研究対象としていることによる。物質に起因する化学現象について捉え、その本質を理解する為の鍵となる因子が「分子」であり、重要な概念である。分子の形成に関わる化学結合の生成や切断は、直接観察出来ない為、化学では、化学変化を化学式、および化学反応式で置き換え、化学量論に基づき考察する。このことが、化学分野の学習に困難が生じる要因となっている可能性がある。そこで、原理・法則に基づいた概念的な考察を苦手とする学生の理解を助ける手立てとして、本プログラムは、実験に加え、分子軌道計算により分子の電子状態を視覚化し表す内容を取り入れることにした。視覚化は、近年、「見える化」とも言い換えられ、計算物質科学分野において、その成果を広く社会に示す際³⁾に、目に見える図の形で物質を表す試みを指して用いられている。これは、物質の物性を決めている電子や分子は目に見えないことから、量子論に基づいた分子軌道計算を行うことで、物質を構成しその性質を決めている分子や原子を目に見える形あるものとして、それらの振る舞いを図に表し、専門でない者にも感覚を通してイメージを掴んで貰うことを主眼としている。本プログラムでは、分子軌道計算に用いる基底関数等の計算条件は、教員

があらかじめ指定することにした為、学生の理解は、感覚的、定性的なものに留まるが、分子軌道計算は分子の性質に対する興味を喚起するツールとして有用と考えられた。学生の現象に対する理解が深まるにつれ、理論的考察にも考えが及ぶことが期待できた。

2. 実験プログラム「ラジカル消去率の測定による物質の抗酸化能の評価」の作成

プログラムの構成

本プログラムでテーマとして取りあげた化学現象は、学部学生の教育目的である為、既知のものとした。具体的には、「物質のもつ抗酸化能」に着目し、抗酸化について分子レベルで理解することを目的とした。プログラムは、対象とした化学現象を示す物質の選択から発現機構の考察まで、科学的思考を深め発展させていく過程を大きく4段階に分け、学生らは段階を追って現象についての理解を深めることが出来る様に構成した。1段階目は、教員による化学現象の選定と提示、および学生による現象の理解。2段階目は、学生によるテーマ設定と分子種の選択。3段階目は、選択した分子種由来の化学現象の測定と解析。4段階目は、測定結果のまとめと考察、および化学現象の発現機構の考察。これらは、先に述べた科学的过程に対して、第1,2段階が「科学的現象の記述, 説明, 予測」、第3段階が「科学的探究の理解」、第4段階が「科学的証拠と結果の解釈」に対応する。

対象学生の選定

本プログラムは、化学実験プログラムであることから、学生が基礎的な化学の概念や考え方を理解していること、かつ基礎の化学実験を履修し、基本的な器具の取り扱い方や実験レポートの書き方を身に着けていることが望ましいと考えた。加えて後の章で示すが、今回、現象の定量的評価に、分光法を用いたことから、学生は初歩の量子化学

の内容を理解し、かつ分光測定の経験がある者が望ましいと考えた。理科専修の専門科目のうち、量子化学に関する授業は、2年次に履修する「化学A」が該当し、授業では量子論に基づき、原子・分子の電子状態、分子の形成や反応に関わる化学結合について学ぶ。また、3年次に開設している「化学実験Ⅲ」では、紫外可視分光光度計を用い、吸収スペクトル測定とその解析法について学ぶ。よって、本学の理科専修の学生の場合、これらの条件を満たすのは4年生となる為、卒業研究を一つの実験プログラムとして設定し、希望した学生に対して実施した。なお、本プログラムは、教員主導型の内容に変更することも可能で、「化学実験Ⅲ」の実験テーマとしての導入も考えている。

2-1 化学現象の選定（1段階目）

化学現象を教員が選定した理由は主に3つある。1つは、化学反応のエネルギー源の多くは熱と光に大別できるが、分子の数は、高等学校の化学の教科書⁴⁾の索引に掲載されているだけでも約420種類程ある。数ある選択肢の中から、実験テーマに適合する分子の組み合わせと反応の最適条件を見出すにはある程度の知識と経験が必要で、知識、経験ともに浅い学生の場合、系の構築に必要な時間の見積もりが困難である。また、安全性の面からも問題がある。科学的思考力の育成は、学生が実際に実験結果を得てから本格化する為、その後の議論に耐えうる確実に再現性のある結果を得る事は重要である。そこで、相応の結果を得る前に時間切れとなるリスクは減らすことが望ましいと考えた。第2に、テーマとなる化学現象を一定期間、同一にすることにより、教員による系統的かつ継続的なプログラムの検討と改良を行うことが可能となること。第3に、卒業研究論文と実験ノートの蓄積とともに、それらを通して学年の異なる学生同士が学びあい、知の伝承と理解の深まりが期待できること。

対象とした化学現象は、次に示した3つの条件

をもとに検討し選定した。1つに、化学研究室テーマである「生命を化学の言葉で語る」との関連で、生体内反応に関わる現象であること。第2に、学生らに既に馴染のある化学的概念に基づいた現象であること。第3に、化学研究室が所持する装置を用いて、対象とする化学現象の定量化を多角的に行えること。以上を踏まえて検討し、「酸化」との関連で「抗酸化」を対象に選んだ。現行の学習指導要領⁵⁾で「酸化」の概念を最初に学ぶのは中学2年生の「化学変化と原子・分子」の単元である。この単元において、「分解」、「化合」に続き、酸素がかかわる化学変化として「酸化」は採りあげられている。「質量保存の法則」から「定比例の法則」つまり化学反応を考える際の中心概念である「化学量論」へと繋げる仲立ちとなる概念が「酸化」である。また、「酸化」はヒトの生活とも密接に関連している。例えば東京書籍の理科の教科書「新しい科学」⁶⁾は、「科学と生活」についてのコラムの箇所ですべて「さび」は酸化の一つと紹介し、物質本来の性質が失われ、役に立たなくなると紹介している。このことは、生体に置き換えても同様に考えることができる。「抗酸化」とは、「酸化」に抗う反応として、抗はそれに抗う、つまり酸化が起こるのを防ぐと説明すれば「抗酸化」は理解できる。生命科学との関連では、生体内で起こる酸化反応も、組織本来の機能が失われるという点で金属等の酸化と共通であり、本来の機能が果たされないことが生命維持の困難さに結びつくことは、段階を追って考えることで理解できる。この様に「抗酸化」は、食品等の酸化による劣化を防ぐ役割から生体防御機能まで含む幅広い領域にまたがる身近な概念である為、「抗酸化」は科学的思考を深め、科学的リテラシーの向上に繋げるのに適したテーマであると考えた。

2-2 抗酸化反応系の選定（1段階目）

2-2-1 抗酸化反応の概要

まず、抗酸化反応の概要について示す。抗酸化は、酸化の標的になる物質を直接的に保護することによる抗酸化と、抗酸化物質（ラジカル種、活性酸素種を除去する能力を持つ物質の総称）が相手を酸化する性質を持つ物質（ラジカル種、活性酸素種）を攻撃し、その酸化力を無くさせることにより標的物質を保護することによる抗酸化の2つに大別出来る。本プログラムで対象としたのは、後者のラジカル種を消去することによる抗酸化である。抗酸化力（抗酸化能、抗酸化活性とも言い換えられる）は、抗酸化物質によるラジカル種、および活性酸素種の除去能を指しており、不対電子の量や、抗酸化物質の添加前後の吸光度や発光強度の相対的な変化量をもとに算出し評価する。評価方法は、反応系と測定原理（装置）の組み合わせにより決まる。図1に、今回選択した実験系の概要を模式的に表した。

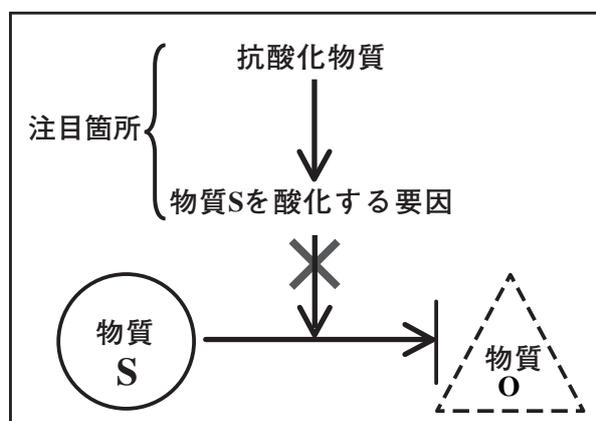


図1 抗酸化反応系の模式図

外枠の実線内が抗酸化反応系全体を示す。「抗酸化物質」により、「物質Sを酸化する要因」が取り除かれることで「物質S」はその酸化物である「物質O」への変化をまぬがれる。生体内物質で「物質S」に該当するのが、タンパク質、脂質、糖質等の生体関連化合物である。図1を生体を模した系と考

えると、最も小さいスケールでは、生命の最小単位である細胞と置き換えられる。プログラムの導入時、分子の普遍的な性質を見出し数値化するには単純な系が好ましいことから、今回は抗酸化反応系のうち、「抗酸化物質」と「物質Sを酸化する要因となるラジカル種」の関係に注目し、反応場（溶液中）における両物質の反応を対象とした。生体内では、抗酸化反応に関連する複数の因子間に相互作用が働く為、フリーラジカル補足活性と抗酸化活性は一致しないと指摘されているが⁷⁾、本実験では、系の特定部分（図1参照）に測定対象を絞っているため、両者は一致していると考えられた。なお、現在のところ、あらゆる系に万能なラジカル消去活性の測定方法は無く、目的にあわせ方法を選択することになる。よって、既報の抗酸化能の評価結果と比較する際には、文献が用いている評価方法を調べ、例えば、用量反応解析からIC₅₀値等を算出した上で比較する等の対処が必要になると考えられた。

2-2-2 ラジカル種の測定原理とラジカル消去率の算出

不対電子を持つフリーラジカル（ラジカル種）は、一般的に化学的に不安定な反応中間体であり、短寿命で反応性に富む為、他の物質を攻撃し酸化する要因となる。不対電子量の測定や、ラジカル種が存在する環境についての情報を得るには、電子スピン共鳴（ESR）法を用いた観測が適している。本実験は、化学研究室内で測定可能な紫外可視吸収スペクトル法と化学発光法を用いた。これらはフリーラジカルの間接測定法であるが、これらの方法での報告も多い。本実験で用いた紫外可視分光光度計は時間分解能を持たない為、ラジカル種は、定常状態での測定が可能で、比較的寿命の長い安定ラジカル種を選択した。なお、フォトダイオードアレー検出器を備えた吸光度計は、吸収の時間分解測定が可能であり、1ミリ秒間隔で反応中間体のラジカル種の吸光測定を行ったとの報告^{8), 9)}がある。

1) 吸光度測定とラジカル消去率の算出

吸光度の値は、島津製作所 UV-3100PC を用いた紫外可視吸収スペクトル測定から得た。用いたラジカル種は、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl（以下 DPPH, CAS No. 1898-66-4）のラジカル（図2）である。図2における「 \cdot 」はラジカルを表している。DPPH は、溶液中で DPPH ラジカルを発生する。溶液中で発生する DPPH ラジカル種は比較的安定なラジカル（分子種）とされ、このラジカルの極大吸収波長（517 nm）（図4の実線（黒色）のスペクトルを参照）の吸光度をエタノール溶液中（常温、脱気なし）で15分間～30分間隔で3時間、連続測定したところ時間0の吸光度に対する3時間後の吸光度の相対減少率は1%以下であった。¹⁰⁾ よって、1回の DPPH 溶液調整あたり3時間内に測定を行った。以下、吸光度測定による DPPH ラジカル消去活性の測定法を DPPH 法と呼ぶ。DPPH 法は、電子供与反応に基づいた抗酸化能の測定法であり、図2の窒素 N 原子上のラジカルに抗酸化物質由来の電子が供与され、NH となりラジカルが消失することを原理としている。¹¹⁾

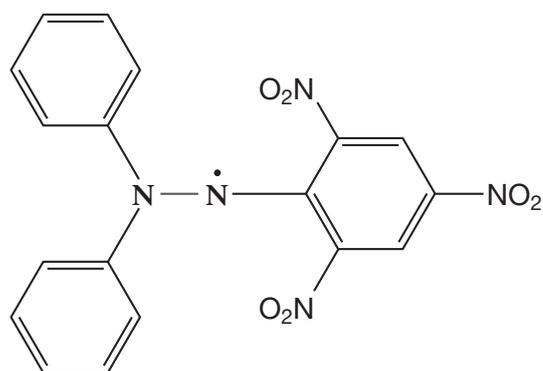


図2 DPPH ラジカルの構造

この DPPH 法の良い点は、測定が簡便であること、ラジカルの消去がラジカル1分子あたり1電子の反応でわかり易いこと、ラジカル消去が溶液の色の変化として明瞭に観測できることにある。図3左側の DPPH を溶解した溶液は DPPH ラジカルを産し、溶液は紫色を呈しているが、抗酸化

物質（カフェ酸, CAS No. 331-39-5）と混合させると, DPPH ラジカルは消失し, それに伴い混合溶液は図3右側の薄い黄色に変化した. この溶液の色の変化を吸収スペクトルで観測したものが図4である. ラジカル由来の517 nmの吸収極大のピーク（図4の黒色実線）が, 抗酸化物質と混合することで減少する様子が観測された（図4の水色波線）. DPPH法は反応（ラジカル消去反応）と物質の性質（抗酸化能）を視覚で捉えることが可能な系であり, 取扱いが容易である為, 本プログラムの実験方法に適していると判断した.

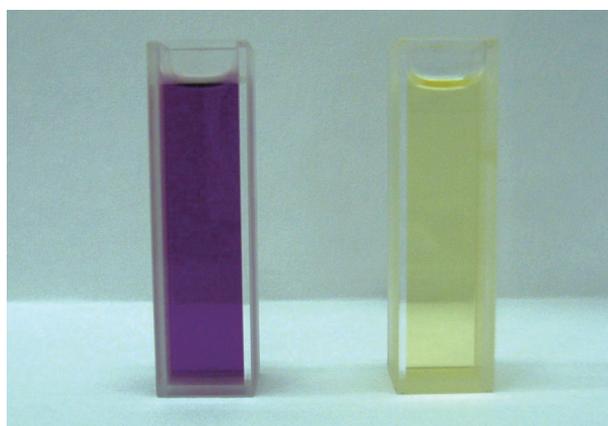


図3 DPPH ラジカル消去反応前後の様子
左: DPPH 溶液、右: DPPH 溶液と抗酸化物質（カフェ酸）のモル比 1:1 混合溶液、ともに溶媒はエタノール

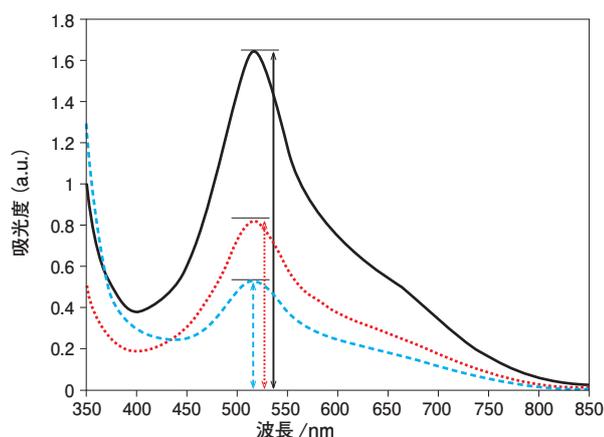


図4 ラジカル消去反応前後の吸収スペクトル
黒色実線: DPPH 溶液の吸光度、赤色点線: DPPH 溶液の吸光度 /2、水色波線: DPPH 溶液と抗酸化物質（カフェ酸）のモル比 1:1 混合溶液の吸光度、いずれも溶媒はエタノール

なお, DPPH法の欠点として挙げられることの1点は, 内部標準物質を用いたラジカル量の測定が困難なことである. 今回, 溶媒に溶解させた DPPH は全て DPPH ラジカルとなっていると仮定し, ラジカル消去率を計算した. もう1点は, DPPH ラジカルと同じ可視光領域に吸収帯がある分子の場合, 吸収帯が重なる為, ラジカル消去率を正確に計算出来ないことである. その為, 本実験で用いる抗酸化物質は, 吸収波長帯が DPPH より短波長領域にある π 電子系の広がり比較的小さい小分子を選択した. 今回用いた DPPH ラジカル以外に, フォトダイオードアレー分光光度計による, ガルビノキシルフリーラジカルの 432 nm の吸光度を用いた反応中間体の測定を行った報告^{8), 9)} から, ガルビノキシルフリーラジカルも定常状態の吸収測定に用いることが可能と考えられたので, ラジカル消去活性の測定の際に今後, 使用を予定している.

本実験では, ラジカル消去率の測定は次のように行い算出した. まず等モル濃度の DPPH 溶液と試料（抗酸化物質）溶液を調整し, 各々の吸光度を測定した. 次にそれらを等量で混合した溶液の吸光度を測定した. ラジカル消去率は, 次の式①を用いて計算した.

ラジカル消去率 (%) = $\{(DPPH \text{ 溶液の } 517 \text{ nm の吸光度} / 2) - (DPPH \text{ 溶液と試料溶液の等量混合溶液の } 517 \text{ nm の吸光度})\} \times 100 / (DPPH \text{ 溶液の } 517 \text{ nm の吸光度} / 2) \cdot \cdot \text{式①}$

溶液の濃度は, いずれも $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ とした. これは, 測定に用いた試料の最適濃度より約 10 倍高い設定であるが, DPPH 溶液, 試料溶液, いずれにおいても $1 \times 10^{-4} \text{ M}, 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ の両濃度で吸収スペクトルを測定し, この濃度領域では多量体形成はないと判断し用いた.

2) 蛍光測定とラジカル消去活性の算出

本実験での蛍光測定は, Thermo Fisher Scientific 株式会社の Appliskan を用いて行った. まず始めにラジカル消去活性の測定に用いる化学

発光系の検討を行った。化学発光法は、主として水素原子供与反応を原理とする。測定は、溶媒に、ラジカル源、試料（抗酸化物質）、蛍光物質を添加し、溶液中で生成したラジカルの変化率を、同時に溶液に添加した蛍光物質が発する発光量の変化率を介して求める。試料のラジカル消去活性能が高い場合は、試料を添加しないブランクと発光量は変わらず、ラジカル消去活性能が低い場合は、発光量はブランクと比べ大きく減少する。化学発光法は、このように蛍光物質の発光量を介して、試料のラジカル消去活性能を間接的に評価する。化学発光法の対象となるラジカル種は、寿命の短い分子種である。具体的な分子種を以下に示した。生体においては、ヒトなどの好気性生物が呼吸し体内に取り込んだ酸素の一部が、エネルギー代謝の際に電子伝達系で還元されて、「活性酸素種」を生じる。酸素分子の1電子還元で生じるのがスーパーオキシドラジカル $O\cdot_2$ であり、以下順次、過酸化水素 H_2O_2 、ヒドロキシラジカル $\cdot OH$ 、 $\cdot OH$ 一重項酸素 1O_2 と分子種は変化して行く。 1O_2 は、酸素分子が励起して生じる励起一重項酸素を指す。少量の活性酸素種は、生体内の情報伝達シグナルとして働くが、ラジカルはその反応性の高さから体内で過剰に生じると、生体内物質、例えばタンパク質等を攻撃し変性させたり、DNAに損傷を起こさせるなどして、物質が本来持つ機能を果たせなくする為、過剰なラジカル種の除去や発生を抑えることは特に医学分野において重要な課題となっており、非常に多くの研究がなされている。活性酸素種は、高血糖や光暴露などをストレス源として発生し、特に糖尿病との関連が指摘されている。本実験で対象としたのは、過酸化水素から発生させたヒドロキシラジカルであった。その理由は、ヒドロキシラジカルは活性酸素の中で最も反応性が高く、最も酸化力が強い分子種である為である。寿命は、 $1\ \mu$ 秒（百万分の1秒）とされており、移動距離は $10\ \mu$ mとされ、このラジカルのごく近傍でのみの反応となるが、酸化力が強い為、連鎖的な反応の引き金となる。¹²⁾

蛍光を用いた抗酸化能の評価は、ORAC法とよばれる方法を用いた報告が数多くある。ラジカル源として用いる2,2'-アゾビス-(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩(以下AAPH, CAS No. 2997-92-4)が、脂質ペルオキシラジカルを模していることによる。ORAC法は、蛍光物質にフルオレセイン、ラジカル源としてAAPH、抗酸化物質の3物質を混合後、熱分解させ、AAPHの熱分解で発生したペルオキシラジカルの抗酸化物質による蛍光の抑制率を蛍光強度の時間変化から算出する方法である。¹¹⁾測定系の検討を行ったところ、この方法は煩雑で、標品として6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid(以下Trolox, CAS No. 53188-07-1)を用い、Trolox標準での抗酸化能の評価となる為、同一方法を用いての値の比較は行えるが、結果の一般化には不向きと考えられた。また、フルオレセインは活性酸素種に対して特異性が無い為、複数の活性酸素種が混合した状態の結果を観測している可能性が考えられた。そこで、特定の活性酸素種と特異的に反応する蛍光物質を探した所、東大の浦野らによるヒドロキシラジカルと特異的に反応するフルオレセイン修飾化合物を合成したとの報告¹³⁾があり、論文掲載の2種の蛍光物質を購入し、現在、蛍光測定条件の検討を行っている。

2-3 ラジカル消去反応におけるテーマ設定と分子種の選択（第2段階目）

1) ラジカル消去反応におけるテーマ設定

本実験では、試料分子がもつ抗酸化能をラジカル消去率で評価しているが、分子が抗酸化能を発揮する為に必要な条件として大きくは次の3条件が挙げられる。①相手となるラジカル種との反応の適合性、②分子自身の性質（大きくは水溶性か脂溶性か）と反応場の環境との適合性、③反応場における分子の存在状態や濃度である。系の構築の際には、これらの条件の組み合わせが重要にな

る。例えば、ポリフェノールは、フェノール性水酸基を複数その分子構造中に持ち、この水酸基からラジカル種への水素移動反応によりラジカル種を消去することで抗酸化のはたらきをすると考えられている。この水素移動反応は、水素ラジカル生成による1段階反応と、電子移動とプロトン移動による2段階反応による経路があることが示唆されている。先に述べたフォトダイオードアレー分光光度計を用いたガルビノキシルフリーラジカルの432 nmの吸光度を用いた反応中間体の測定を行った測定から、反応経路が同定された系もある。¹⁴⁾ 当研究室の吸収測定装置は時間分解の機能を持たないので、反応経路の追跡は出来ないが、系の環境（主には溶媒）を変化させる事により、水素移動反応経路で起こっている化学反応について推測する事は可能と考えられた。例えばこれは、ラジカル消去反応について研究する際の実験テーマになる。これまでに実際に設定されたテーマとしては、系の環境、分子が内包する官能基に関連するものがあつた。本報告には、系の環境と抗酸化能についての検討結果を2-4章に紹介した。なお、現在、卒業研究として進行中であるので、詳しい系の記載は差し控えるが、分子構造と抗酸化能の関係を系統立てて調べることを目的にテーマを設定した学生が出てきたことは好ましい。

2) 抗酸化物質（候補分子種）の選択

候補となる分子種は、生体内に存在するものとして、スーパーオキシドジムスターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンジムスターゼ等がある。生体内以外では、抗酸化物質は主に植物中に内包されている。植物はその構造に、先に述べたポリフェノール、もしくはフェノール酸を含んでいる。ポリフェノールは、ベンゼン環に水酸基、あるいはメトキシ基を持つ化合物の総称である。植物が紫外線のエネルギーから身を守り、またその抗菌効果で外敵から身を守るのに必要な成分であるので、植物性食品には必ず含まれている。その種類は270万種類とも見積もられている¹⁵⁾ ので、学生らは、自分が何を知りたいのか、1) のテーマ

設定をもとに、その選択基準を明瞭にして分子を選択することが必要となる。抗酸化物質は、二木により¹⁶⁾、その機能をもとに次に示した4種類に分類されていた。

- ① 予防的抗酸化物質（酸化ストレスの原因となる内因性・外因性の活性酸素種、フリーラジカルそのものの発生を防ぐ。）
- ② ラジカル捕捉型抗酸化物質（フリーラジカル等の捕捉による連鎖反応開始の抑制や連鎖反応の成長を阻止する役割を持つ。）
- ③ 毒性物の排除、損傷の修復、損失の再生型抗酸化物質（障害を受けた生体分子の修復や再生をする物質。）
- ④ 適応機能（必要に応じて抗酸化酵素などを産生し、必要な場所に遊走させる。アポトーシスの誘導も酸化に対する防御機構である。）

既知の物質の選択の際には、この4つの機能を踏まえて、文献を手掛かりに考えることで、分子の選択は行える。学生らは、選択の際に機能を考えるより、まず自分の好みの食品、自身の地元の名産品のどちらかを選択する場合がほとんどであった。分子の選択後は、分子の入手が次の問題となる。ポリフェノールは、種類が多く、重合体を形成し、分離により糖を失うと失活する場合がある等、その性質は様々で、単離には困難を伴う場合が多く、実際に当研究室にて、アントシアニン類の分離を試みたが、測定に必要な量を得るにはHPLCが必要と判断した。市販品は販売されていても高額であった。学生らは、ここで改めて分子の化学的、機能的性質に着目し、候補分子種を再選択した。例えば、注目分子と類似の骨格構造を持つ安価で安定な化合物への変更、類似の性質を持つ他の化合物への変更等の工夫であった。これまでに、学生らが選択した植物性食品は緑茶、リンゴ、コーヒー豆、大正金時豆、レモン等であり、その含有分子に着目した。食品以外では、植物由来の精油とその成分に着目していた。

2-4 ラジカル消去率の測定と解析 (3段階目)

分子種が存在する系の環境が、抗酸化能に影響したと考えられた実験結果の概要をまとめた。10) テーマは、抗酸化能と分子の存在環境(溶媒)である。コーヒー豆の成分のクロロゲン酸(CAS No. 327-97-9)とその7種の代謝産物(カフェ酸, フェルラ酸, CAS No. 537-98-4, ジヒドロフェルラ酸, CAS No. 1135-23-5, イソフェルラ酸, CAS No. 537-73-5, m-クマル酸, CAS No. 14755-02-3, キナ酸, CAS No. 77-95-2, 馬尿酸, CAS No. 495-69-2)のラジカル消去率をDPPH法を用いて算出した。測定と解析は、本報告の2-2-2の1)に準じて行った。結果を以下にまとめた。(1) カフェ酸のエタノール溶液中のラジカル消去率が約90%と最も大きかった。2番目に大きかったのはクロロゲン酸であり約40%であった。分子構造との関係で考えると、カフェ酸は骨格構造から糖が外れたアグリコン、クロロゲン酸は配糖体と違いがあり、糖が結合することで、抗酸化能は低下した。(2) クロロゲン酸とカフェ酸のラジカル消去率は経時変化と溶媒変化を示した。AWA(アセトン:水:酢酸(v/v(%));70:29.5:0.5)溶液中のラジカル消去の半減時間(Rs値)は、2分子ともエタノール中と比較し10倍以上大きかった。また、ラジカル消去率が大きいほど、Rs値は小さく、エタノール溶液中の結果がそれに該当した。抗酸化能は環境(溶媒)の影響を受けた。

2-5 ラジカル消去機構についての考察 (第4段階目)

現在、ラジカル消去活性を見出した分子種を対象に分子軌道計算を試みている。ここではカフェ酸のHOMO(図5)とLUMO(図6)の電子密度図を示した。図中、白丸は水素、赤丸は酸素、灰色の丸は炭素原子を意味する。計算は、Gaussian09W¹⁷⁾のソフトを用いて行った。これまで試みた計算では、計算機に搭載したCPUと

メモリから、分子数が50程度が精度の高い基底関数型の計算が収束する上限と考えられた。現在、各分子のHOMO, LUMOの電子密度と軌道のエネルギー、およびフェノール性水酸基の結合の解離エネルギーと抗酸化能との関連について検討している。詳細は、野極の実験結果¹⁰⁾とあわせて論文としてまとめる予定である。

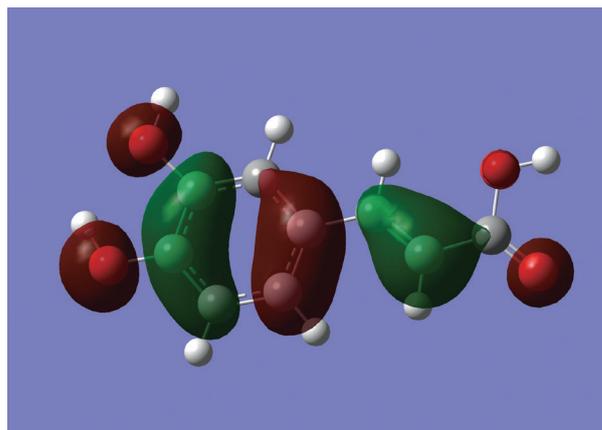


図5 カフェ酸のHOMOの電子密度図

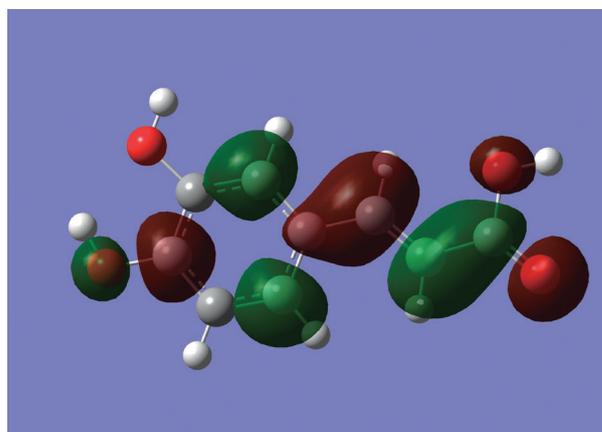


図6 カフェ酸のLUMOの電子密度図

3. まとめと今後の課題

- 1) 抗酸化に取り組んだ学生らの卒業研究論文から、DPPH法を用いることで、物質の持つ抗酸化能の概念は理解出来たと判断された。
- 2) 蛍光を用いた抗酸化能の評価は、目的とする活性酸素種に特異的の反応を示す分子種の選択に時間を要し、実験系の構築が中途であり、本報告に最終結果は載せられなかった。結果は論文

にまとめる。

- 3) 分子軌道計算結果は、直観的でわかりやすい為、学生の分子の理解を助ける。分子軌道理論を詳細に理解出来ずとも、まずは学生自身が分子軌道計算を身近に感じられるよう、今後、計算条件の選択法についてのマニュアルを作成、提示し、学生が1人で計算出来るように準備する。
- 4) ラジカル消去率に関連し、結合の解離エネルギー計算を試みているが、精度の高い基底関数を用いた計算を試みると、メモリ不足で計算が度々止まり、結論が得られていない。今後、計算方法を更に検討すると共に、外部計算センターの計算機を併用するなど、改善策を講じたい。

付記

本実験プログラムは、平成25年度と26年度に学長調整金による教育改善支援(B)に申請し採択され、助成を受けて作成、実施したものである。学長調整金の申請課題名は、平成25年度は「化学現象の多角的な測定および解析を通じた学生の科学的・論理的思考力向上の試み」であり、平成26年度は「物質の抗酸化能の測定方法の最適化と理論計算を用いた電子状態の視覚化による学生の科学的・論理的思考力向上の試み」であった。平成25年から平成26年の間に実験プログラムを作成、実施した。測定手法に蛍光測定が加わったことで、多角的な測定が可能となり、また対象のラジカル種として実際に生体に生じる活性酸素種を加える事ができたことは有益であった。より生活に近い系での検討が可能になって来た事からも、学生の科学的リテラシーの向上を目指し、継続してプログラムを実施していく考えである。

謝辞

学長調整金への申請を採択して頂いたことから、本実験プログラムを立ち上げる事が出来ました。申請を採択して下さいました学長の野島正也先生

に深謝申し上げます。学生らの科学的思考力向上の助けとなるよう、優れた実験系を作成すると共に、理論的考察を深める為、分子軌道計算を学生が円滑に行えるよう、今後も引き続きプログラムの改善を進め、実施して行きたいと思えます。

引用・参考文献

- 1) 文部省科学省. PISA 調査 (科学的リテラシー及びTIMSS 調査 (理科) の結果分析と改善の方向 (要旨) 資料4-8. (http://www.mext.go.jp/a_menu/shotou/gakuryoku/siryu/05020801/027.html) (参照2015年10月28日)
- 2) 船山智代, 松岡多恵子. 文教大学教育学部紀要. 2013. 第47集. p. 179-190.
- 3) CMSI WEB. 第3回TUT-CMSI 計算物質科学見える化シンポジウム〜物質と社会をつなぐ〜. 2015年2月28日.
http://www.cms-initiative.jp/ja/events/20150228_mieruka (参照2015年10月28日)
- 4) 井口洋夫, 木下實ほか14名編修. 化学. 平成26年1月25日発行. 実教出版株式会社. p. 412-415.
- 5) 文部科学省. 中学校学習指導要領解説理科編. 平成20年9月. 文部科学省. p. 38-43.
- 6) 田村定矩, 藤嶋昭ほか48名. 新しい科学2年. 平成26年2月10日発行. 東京書籍株式会社. p. 39.
- 7) 小俣葉, 二木鋭雄. FRAGRANCE J. 3. 95-98 (2008).
- 8) I. Nakanishi et al., J. Am. Chem. Soc. 124, 5952-5953 (2002).
- 9) T.Ochiai et al., 日本食品化学学会誌 10(1), 13-21, 2003.
- 10) 野極華奈. 文教大学教育学部学校教育課程理科専修. 卒業研究論文. p.38 (2013).
- 11) 渡辺純, 沖智之ほか3名. 化学と生物 47(4), 237-243, 2009.
- 12) 日本化学会監修. 活性酸素. 平成16年. 丸善. p.16.
- 13) Setsukinai K., Urano Y., et. al., J.Biol. Chem. 278, 3170-3175 (2003).
- 14) I. Nakanishi et al., J. Phys. Chem. A 106,11123-11126 (2006).
- 15) 荒井総一ら. 機能性食品の事典. 2008年. 朝倉書店. p.191-208.
- 16) 二木鋭雄. 化学と生物 37(8), 554-561, 1999.
- 17) Gaussian, Inc. Gaussian 09W 32-bit マルチプロセッサ版と GaussViewW 5 Bundle 教育用.